

Université de Bordeaux

Année 2014

THESE
Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX

Mention : Sciences, Technologie, Santé
Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement
Le 03 décembre 2014 par :

Emilie FAGGIANI

Née le 04 janvier 1988 à Bordeaux

Les systèmes monoaminergiques : Implication dans la physiopathologie et la thérapie de la maladie de Parkinson

Membres du jury :

Mr B. BIOULAC	PU-PH à l'université de Bordeaux	Président
Mme L. KERKERIAN-LEGOFF	Directrice de Recherche CNRS, Marseille	Rapporteur
Mr M. SAVASTA	Directeur de Recherche INSERM, Marseille	Rapporteur
Mr D. GUEHL	PU-PH à l'université de Bordeaux	Examineur
Mr A. BENAZZOUZ	Directeur de Recherche INSERM, Bordeaux	Directeur de thèse

A mes parents,
ma famille,
mes amis

Remerciements

Je remercie tous les membres de l'IMN qui ont participé de près ou de loin à la bonne marche de mon travail de thèse.

Je remercie les membres du jury, Lydia Kerkerian-legoff, Marc Savasta, Dominique Guehl et Bernard Bioulac pour le temps précieux qu'ils ont mis en œuvre à expertiser mes travaux de thèse avec justesse et dans la bonne humeur !

Mais avant tout, je tiens à remercier Hamid, un peu mon second papa, qui m'a permis de passer les 5 années les plus enrichissantes de ma vie (du moins pour mon premier quart de siècle...). Merci pour m'avoir donné goût à la recherche alors que je ne l'avais jamais envisagé. Et oui, contre toute attente, dès mon premier jour de stage, je savais ce que je voulais, CHERCHER (et trouver si possible...). Merci pour ton soutien, ton écoute, ta compréhension, la confiance que tu m'as accordée, bref merci pour être qui tu es et non pas seulement en ce qui concerne le travail. MERCI tout simplement pour cette rencontre et pour m'avoir emmenée jusqu'ici aujourd'hui.

Evidemment, tous les gens qui m'ont entourée durant ces années n'y sont pas pour peu :

Merci à Claire de m'avoir tout appris à mon arrivée, les manips, la rigueur, mais également le bricolage (pro du système D).

Merci aux premières amies du « couloir », ici depuis le tout début, Coralie et Léa, toujours présentes, jusqu'au jour de la thèse et avec qui c'est loin d'être fini !

Merci aux « anciennes » du labo qui m'ont intégrée malgré mon jeune âge... (un peu de folie ne fait pas de mal ;)), Steph, Audrey, Laura, Emilie avec qui j'ai passé tellement de bons moments, que ce soit, durant les sessions potins au labo, en dehors, les weekends un peu plus loin.. Merci d'avoir égayé la plupart de mes journées et de m'avoir souvent aiguillée dans mes décisions ! Et allez encore des amies en plus !

Non Mélou je ne t'ai pas oublié !! Mais tu es quand même un peu à part... Ma voisine de bureau devenue mon amie, ma confidente. Bon je ne suis pas partie quand toi... ni toi quand moi... Quand ? Quoi ? Enfin bref, même si je ne te comprends pas toujours, merci d'avoir été là tout ce temps, aujourd'hui encore malgré la distance (l'appel du Saint Georges est plus fort que tout), sans toi ça n'aurait pas été pareil.

Après toutes ces filles, un grand merci à l'unique, l'irremplaçable, notre bougonneur, barman, DJ, mon soutien jusqu'à la fin... Fredo !!! Ta pote rockeuse te remercie pour tout : le travail fait pour moi (avec un gros plus pour la dernière ligne droite), les conseils et puis tout le reste, c'était « givé » bien !

Je n'oublie pas mes autres collègues avec qui j'ai partagé mon quotidien et qui m'ont tous été d'une très grande aide:

Philippe, le plus déjanté et passionné des profs et des collègues que j'ai connu, qui m'a confortée maintes et maintes fois dans mes choix !

Aude, ma tout première formatrice ! Mes étudiants de Master, qui m'ont certainement plus appris que je ne l'ai fait, Brice, Fanny, Bastien, Youssra et tous les autres Omar (monsieur bonne humeur), Anass (plus calme et parfois ça fait du bien !), Mounia (notre neurologue préférée)...

Merci à tous les autres, avec qui j'ai partagé de bons moments, lors de congrès, de soirées ou pour une petite pause au labo : Jonathan, Cristina, Sylvia, Bérangère, Thomas, Nico, Estelle, Daisuke, Marion, Mathieu, Camille, Steph (doudou pour faire plaisir aux zouaves...) et les fameux zouaves que j'ai découvert plus tard (mieux vaut tard que jamais): Tho hai et Hugues. Merci à vous tous et à ceux que j'oublie (oui il y a eu beaucoup de monde) pour votre bonne humeur et tout le reste.

Merci à Yasin Temel et à toute l'équipe de Maastricht pour m'avoir si chaleureusement accueillie et pour m'avoir permis de réaliser une partie de ma thèse chez eux. Merci à Mark Janssen sans qui je ne parlerais certainement pas anglais, merci à Rinske Vlamming ma première coloc, pour son accueil et sa patience pour me comprendre surtout au début... Merci à Céline Meriaux, ma seconde coloc, et seule française (ça fait du bien de parler français quand même).

Mais en dehors du laboratoire et ce sont de loin les plus importants, ceux qui m'ont permis de réaliser ces années de thèse dans les meilleures conditions :

Merci à ma famille, mes amis, à tous les gens qui comptent pour moi et qui étaient là dans les bons comme dans les mauvais moments (désolée de ne pas faire de liste mais vous êtes tellement nombreux !). Vous avez toujours cru en moi et même si vous allez dire que c'est normal, ça fait toujours un bien fou de le savoir ! Je suis tout simplement heureuse et comblée de vous avoir tous !

MERCI, MERCI et encore MERCI

Le travail effectué pendant cette thèse a permis la réalisation des communications suivantes

Publications dans des revues à comité de lecture

Retailleau A., Leinekugel X., **Faggiani E.**, Delaville C., Nora A., Benazzouz A. Involvement of dopamine deficiency in memory disorders: behavioral, biochemical and electrophysiological studies in 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism. *Submitted*

Faggiani E., Delaville C., Benazzouz A. Combined depletions of monoamines alter the efficacy of subthalamic deep brain stimulation on motor and anxiety disorders but not depression. *Submitted*

Faggiani E., Janssen M., Naudet F., Temel Y., Benazzouz A. Norepinephrine and serotonin neuron degeneration alter motor performance in a rat model of advanced stage Parkinson's disease *En préparation*

Faggiani E., Lesioning serotonin cells interferes with Levodopa-induced improvement of anxiety and alters the neuronal activity of basolateral amygdala. *En préparation*

Faggiani E., Janssen M., Naudet F., Temel Y., Benazzouz A. Depression and apathy disorders have different origins in Parkinson's disease. *En préparation*

F. Kölbl, J. Sabatier, G. N'Kaoua, F. Naudet, **E. Faggiani**, A. Benazzouz, S. Renaud and N. Lewis. Characterization of a Non Linear Fractional Model of Electrode-Tissue Impedance for Neuronal Stimulation.

F. Kölbl, G. N'Kaoua, F. Naudet, F. Berthier, **E. Faggiani**, S. Renaud, A. Benazzouz and N. Lewis. An embedded deep brain stimulation for biphasic chronic experiments in freely moving rats. IEEE transactions on biomedical circuits and systems. 2014.

Communications affichées

Faggiani E., Delaville C., Benazzouz A. *Impact of monoaminegic depletions on the efficacy of anti-parkinsonian treatment.*

- 4th Conference of The Mediterranean Neuroscience Society (MNS) (Istanbul 2012)
- Society for Neurosciences (SFN) (New Orleans 2012)
- 11th International Basal Ganglia Society Meeting (IBAGS) (Eilat 2013)
- 11th Symposium of French Society of Neuroscience (Lyon 2013)

Faggiani E., Janssen M., Naudet F., Temel Y., Benazzouz A. *Impact of combined depletions of monoamines on parkinsonian-like anxiety, depression and motivation.* 9th FENS meeting (Milan July 2014)

Communication Orale

Faggiani E., Delaville C., Benazzouz A. Combined depletions of monoamines alter the efficacy of subthalamic deep brain stimulation on motor and anxiety disorders but not depression. COST CM1103 Action annual conference, 9th October 2014, Bordeaux.

La maladie de Parkinson est caractérisée par la manifestation de symptômes moteurs principalement dus à la dégénérescence du système dopaminergique. Malgré l'accent mis sur les déficits moteurs, la maladie de Parkinson est également caractérisée par des symptômes non moteurs, incluant l'anxiété et la dépression, qui sont sous-étudiés et de ce fait pas bien traités. Alors que certaines études cliniques ont suggéré que l'anxiété et la dépression pourraient être associées à la dégénérescence des neurones dopaminergiques, d'autres ont suggéré l'implication de la dégénérescence des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques dans les troubles observés mais également dans les effets induits par la Lévodopa et la stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique.

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle respectif de la dopamine, de la noradrénaline et de la sérotonine dans la manifestation des déficits parkinsoniens moteurs et non moteurs chez le rat. L'ensemble de nos résultats démontre que malgré l'importance du système dopaminergique, la perturbation des trois systèmes monoaminergiques joue un rôle important à la fois dans la manifestation des troubles moteurs et non moteurs.

Nous avons également étudié l'impact des monoamines sur l'efficacité des traitements antiparkinsoniens, à savoir, la Lévodopa et la stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique, sur les troubles observés. Nos résultats montrent que la déplétion combinée des systèmes monoaminergiques peut altérer l'efficacité de la Lévodopa ainsi que de la stimulation cérébrale profonde sur certains troubles. Ces résultats peuvent expliquer le manque d'efficacité des traitements antiparkinsoniens chez certains patients et la difficulté à traiter tous les symptômes.

Pour finir, nous avons voulu mettre en évidence le lien entre le noyau sous-thalamique, structure excitatrice des ganglions de la base et les troubles moteurs, ainsi que l'amygdale basolatérale et l'habénula latérale, structures impliquées dans les comportements émotionnels, et les troubles non moteurs. Nous avons mis en évidence le parallèle existant entre les modifications du mode de décharge des neurones du NST et les troubles moteurs, les changements de l'amygdale basolatérale et les troubles anxieux ainsi que ceux de l'habénula latérale et les troubles dépressifs.

Les résultats de ces travaux de thèse ont donc permis d'apporter de nouvelles évidences sur l'implication des trois systèmes monoaminergiques dans la physiopathologie et la thérapie de la maladie de Parkinson.

Mots clés : Maladie de Parkinson, dopamine, noradrénaline, sérotonine, moteur, non moteur, stimulation cérébrale profonde, Lévodopa, noyau sous-thalamique, amygdale basolatérale, habénula latérale.

Abstract

Parkinson's disease is characterized by the manifestation of motor symptoms mostly associated with the degeneration of dopaminergic neurons. While Parkinson's disease is often focused on motor deficits, the disease is also characterized by non-motor deficits, including anxiety and depression, which are under studied and consequently are not well treated. Whereas some clinical studies suggested that anxiety and depression could be linked to the degeneration of dopaminergic neurons, others suggested the involvement of norepinephrine and serotonin in the observed symptoms and also in the efficacy of Levodopa and deep brain stimulation of the subthalamic nucleus.

In a first time, we investigated the respective role of the neuronal degeneration of dopamine, noradrenaline and serotonin in the manifestation of motor and non-motor parkinsonian-like disorders in the rat. Our results demonstrate that despite the importance of the dopaminergic system, the disturbances in the three-monoaminergic systems play a key role in the manifestation of motor and non-motor deficits.

In a second time, we studied the impact of monoamine depletions on the efficacy of antiparkinsonian treatments, the Levodopa and deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. Our results showed that the combined depletions could deteriorate the efficacy of the Levodopa and of the deep brain stimulation on some deficits. Together, these results can explain the lack of efficacy of the antiparkinsonian treatments in some patients and the difficulty to treat all the symptoms.

Finally, we investigated the link between the subthalamic nucleus, which is an excitatory structure of the basal ganglia, and the motor deficits, as well as the involvement of the basolateral amygdala and the lateral habenula in emotional control of the behavior, and non-motor deficits. We showed the parallel between changes in the neuronal activity of the subthalamic nucleus and the motor deficits, of the basolateral amygdala and anxiety and of the lateral habenula and depression.

Results from this thesis provide new evidences on the involvement of the three-monoaminergic systems in the pathophysiology and the therapy of Parkinson's disease.

Key words: Parkinson's disease, dopamine, norepinephrine, serotonin, motor, non-motor, deep brain stimulation, Levodopa, subthalamic nucleus, basolateral amygdala, lateral habenula.

Abréviations

5-HT : sérotonine
5,7 DHT : 5,7-Dihydroxytryptamine
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
BLA : amygdale basolatérale
CeA : noyau central de l'amygdale
COMT : catéchol-O-méthyl transférase
COX : cytochrome oxydase
CPF : cortex préfrontal
DA : dopamine
DO : densité optique
DSP-4 : N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine
GPe : globus pallidus externe
GPi : globus pallidus interne
HPLC : chromatographie liquide à haute performance
LC : locus coeruleus
L-Dopa : L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LHb : habenula latérale
MFB : faisceau médian du télencéphale (medial forebrain bundle)
MP : maladie de Parkinson
MPTP : Methyl-4- Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine
NA : noradrénaline
NE : norepinephrine
NST : noyau sous thalamique
PAF : paraformaldéhyde
pCPA : p-chlorophényl-alanine
RD : raphé dorsal
RM : raphé médian
SHF : stimulation à haute fréquence
SNc : substance noire pars compacta
SNr : substance noire pars reticulata
TH : tyrosine hydroxylase
VTA : aire tegmentale ventrale

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I. MALADIE DE PARKINSON	3
II. SYSTEMES MONOAMINERGIQUES	4
II.1. Système dopaminergique et Substance noire pars compacta.....	4
II.1.1. Les voies dopaminergiques.....	4
II.1.2. SN et maladie de Parkinson	5
II.2. Système noradrénergique et Locus Cœruleus	6
II.2.1. Généralités	6
II.2.2. Locus Cœruleus.....	6
a) Anatomie du LC	6
b) Rôles physiologiques et dérégulation du Locus Coeruleus	7
II.2.3. Noradrénaline: implications pathologiques	8
a) LC et maladie de Parkinson	8
b) Noradrénaline et symptômes Parkinsoniens.....	9
II.3. Système sérotoninergique et Raphé Dorsal	10
II.3.1. Généralités	10
II.3.2 Anatomie du Raphé Dorsal	11
II.3.3. Sérotonine: rôles physiologiques et implications pathologiques.....	11
a) Rôles physiologiques et dérégulation du Raphé Dorsal	11
b) Raphé Dorsal et maladie de Parkinson.....	12
II.4. Interactions des trois systèmes monoaminergiques.....	13
III. SYMPTOMES ET TRAITEMENTS	14
III.1. Symptômes moteurs.....	14
III.2. Symptômes non-moteurs	15
III.2.1. Anxiété	16
III.2.2. Dépression.....	17
III.3. Traitements	18
II.3.1. Traitements pharmacologiques :.....	19
II.3.2. Traitement chirurgical: stimulation à haute fréquence (SHF) du noyau sous thalamique (NST)	21
IV. GANGLIONS DE LA BASE	22
IV.1. Organisation anatomo-fonctionnelle	22
IV.2. Le noyau sous-thalamique: plaque tournante des ganglions de la base.....	25
IV.2.1. Considérations anatomiques du NST.....	25
IV.2.2. Considérations fonctionnelles du NST	27
V. STRUCTURES LIMBIQUES IMPLIQUEES DANS LES TROUBLES NON-MOTEURS DE LA MALADIE	28
V.1. Amygdale	28
V.1.1. Considérations anatomiques de l'amygdale	28
V.1.2. Innervation	28
V.1.3. Amygdale et anxiété	29

V.1.4. BLA et maladie de Parkinson.....	30
V.2. Habenula	32
V.2.1. Considérations anatomiques de l'habenula.....	32
V.2.2. Innervation	32
a) Afférences et efférences	32
b) Systèmes monoaminergiques.....	33
V.2.3. Habenula et dépression	35
V.2.4. Habenula et maladie de Parkinson.....	36
OBJECTIFS GENERAUX	38
MATERIEL ET METHODES.....	39
I. MODÈLE D'ÉTUDE	41
I.1. Différents groupes d'animaux utilisés et chronologie	41
I.1.1. Déplétions DAergique, NAergique et 5-HTergique :	41
I.1.2. Lésion du système DAergique:	42
I.1.3. Lésion du système noradrénergique	43
I.1.4. Lésion du système 5-HTergique.....	43
I.2. Nouveau modèle de déplétions monoaminergiques par lésion des corps cellulaires	43
I.2.1. Lésion du système DAergique.....	44
I.2.2. Lésion du système noradrénergique	45
I.2.3. Lésion du système 5-HTergique	45
I.3. Application des traitements antiparkinsoniens	45
I.3.1. Stimulation à Haute Fréquence (SHF) chez l'animal vigilant	45
I.3.2. Administration i.p. de Lévodopa (L-Dopa).....	46
II. ETUDE COMPORTEMENTALE	46
II.1. Mesure de l'activité locomotrice.....	46
II.1.1. Evaluation de la catalepsie: Bar test	46
II.1.2. Evaluation de l'activité motrice globale: actimétrie.....	47
II.1.3. Evaluation de la coordination motrice: Catwalk	47
II.1.4. Evaluation de l'activité motrice: Choice reaction time task (CRTT) dans le Skinner box	48
II.2. Mesure de l'anxiété et de la peur: Elevated plus maze	49
II.3. Mesure des comportements dits "d'anhédonie, de motivation et de dépression"	50
II.3.1. Test de la préférence au sucrose ("anhédonie")	50
II.3.2. Test dit « de dépression »: Test de la nage forcée (FST):	50
II.3.3. Test dit de motivation: Progressive ratio task (PR10) du Skinner box	51
II.4. Applications expérimentales des tests comportementaux et analyses statistiques	51
II.4.1. Effets des déplétions monoaminergiques	51
II.4.2. Effet des traitements antiparkinsoniens.....	51
III. ELECTROPHYSIOLOGIE IN VIVO CHEZ LE RAT ANESTHESIE	52
III.1. Enregistrement extracellulaire unitaire:	52
III.1.1. Chirurgie:	52
III.1.2. Caractéristique des électrodes d'enregistrement:.....	52
III.2. Acquisition des signaux	52
III.2.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones	52
III.2.2. Modulation de l'activité des neurones des structures limbiques par la lévodopa	53

<i>III.3. Analyse de l'activité neuronale enregistrée:</i>	53
<i>III.4. Analyses statistiques:</i>	55
III.4.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones:	55
<i>IV. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE</i>	55
IV.1. Vérification des sites d'implantations et d'enregistrements	55
IV.2. Vérification de la lésion des neurones monoaminergiques	56
IV.2.1. Tyrosine Hydroxylase	56
IV.2.2 Vérification de la lésion des neurones sérotoninergiques dans le RD	58
IV.2.3 Analyse stéréologique	59
<i>V. DETERMINATION BIOCHIMIQUE DES CONTENUS TISSULAIRES EN MONOAMINES</i>	60
V.1. Traitement du tissu:	60
V.2. Analyse par HPLC des surnageants:	60
V.3. Détection électrochimique:	60
V.4. Analyses statistiques:	61
ARTICLE 1	63
ARTICLE 2	91
ARTICLE 3	127
ARTICLE 4	157
DISCUSSION	191
I. IMPORTANCE DES MONOAMINES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE	194
1) <i>Moteurs</i>	194
2) <i>Anxiété</i>	198
3) <i>Dépression</i>	200
II. IMPACT DES LESIONS MONOAMINERGIQUES SUR L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS ANTIPARKINSONIENS	203
1) <i>L-Dopa</i>	204
2) <i>Stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique</i>	207
III. LIEN ENTRE LES LESIONS MONOAMINERGIQUES, LES TROUBLES PARKINSONIENS ET LEURS STRUCTURES IMPLIQUEES	210
1) <i>NST</i>	210
2) <i>Amygdale basolatérale</i>	211
3) <i>Habénula latérale</i>	213
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	215
BIBLIOGRAPHIE	221
ANNEXE	253

Introduction

INTRODUCTION

I. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson a été décrite pour la première fois en 1817 par le médecin anglais James Parkinson comme « paralysie agitante » puis Jean-Martin Charcot la désigne en 1880 comme « maladie de Parkinson ». Elle touche actuellement 1% de la population de plus de 65 ans soit 100 000 personnes en France et plus de 6 millions dans le monde. C'est une maladie neurodégénérative qui est considérée par la communauté scientifique, depuis Ehringer et Hornykiewicz en 1960, comme principalement due à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (DAergiques) de la substance noire *pars compacta* (SNc). Cependant, toutes les voies DAergiques cérébrales sont atteintes, la plus touchée étant la voie nigro-striée, mais le déficit concerne également les voies méso-limbique et méso-corticale qui peuvent jouer un rôle important dans la genèse des troubles cognitifs et certains aspects de l'akinésie (Javoy-Agid and Agid, 1980; Scatton *et al.*, 1982). Bien que l'atteinte du système DAergique soit considérée comme la cause principale de la maladie de Parkinson, de nombreux travaux neuroanatomiques ont démontré la dégénérescence des neurones noradrénergiques (NAergiques) du Locus Cœruleus (LC) (Chan-Palay and Asan, 1989; Ehringer and Hornykiewicz, 1960; Greenfield and Bosanquet, 1953; Tretiakoff, 1919) et des neurones sérotoninergiques (5-HTergiques) du Raphé Dorsal (RD) (Fahn *et al.*, 1971; Scatton *et al.*, 1983; Shannak *et al.*, 1994).

D'après la théorie de Braak (Braak and Del Tredici, 2008), les centres monoaminergiques dégénéreraient de façon caudo-rostrale dans la maladie de Parkinson. Ainsi, à un stade avancé de la maladie, on note une perte d'environ 75 % des corps cellulaires DAergiques de la SNc (Ehringer and Hornykiewicz, 1960), 60% des neurones NAergiques du LC (German *et al.*, 1992), et entre 40-50% des voies 5-HTergiques du RD (Halliday *et al.*, 1990).

La dégénérescence cellulaire n'est jamais totale mais diverses études laissent à penser que le processus dégénératif est continu. Par exemple, dans la SNc, la perte des neurones DAergiques est d'environ 1% par an, alors que chez le sujet normal, la dégénérescence est deux fois moins rapide (Riederer and Wuketich, 1976; Scherman *et al.*, 1989).

II. Systèmes monoaminergiques

II.1. Système dopaminergique et Substance noire *pars compacta*

II.1.1. Les voies dopaminergiques

La dopamine (DA) est largement distribuée dans le système nerveux central des vertébrés, bien que les neurones capables de la produire ne représentent pas plus de 0,3% des cellules cérébrales. Les techniques permettant d'identifier les circuits utilisant la DA ont permis de distinguer 8 voies DAergiques dans le cerveau dont les quatre principales prennent naissance dans le mésencéphale (figure 1). Il s'agit d'abord du faisceau DAergique associé au circuit de la récompense constitué par la **voie méso-limbique** qui a pour origine les neurones de l'aire tegmentale ventrale (ATV) qui innervent plusieurs structures du système limbique dont le noyau accumbens, l'amygdale ou l'habenula. Cette voie est importante pour la mémoire et la motivation de nos comportements. La **voie méso-corticale** met aussi en jeu les neurones de l'ATV qui innervent le cortex frontal et les structures avoisinantes. Un dysfonctionnement de cette voie pourrait être à l'origine des symptômes de la schizophrénie (hallucinations, désordre de la pensée...). La **voie tubéro-infundibulaire**, qui projette de l'hypothalamus vers l'hypophyse et influence la sécrétion de certaines hormones comme la prolactine. Enfin, la **voie nigro-striée** qui projette de la SNc vers le striatum (noyau caudé et putamen) mais aussi vers les autres structures des ganglions de la base, est impliquée dans le contrôle moteur. La dégénérescence de ces neurones est associée aux symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (Benazzouz *et al.*, 2014 ; Smith and Kieval, 2000; Smith and Villalba, 2008).

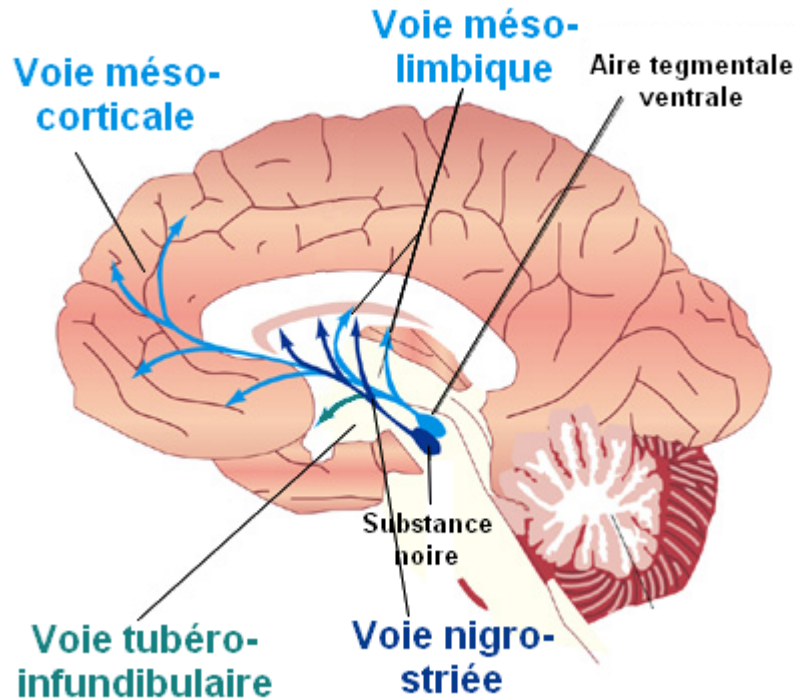


Figure 1: Représentation schématique des quatre voies dopaminergiques centrales. Les voies méso-corticale et méso-limbique proviennent de l'Aire tegmentale ventrale et innervent respectivement le cortex préfrontal et le noyau accumbens. La voie nigro-striée naît dans la SNc et innerve le striatum alors que la voie tubéro-infundibulaire relie l'hypothalamus à l'éminence médiale.

II.1.2. SN et maladie de Parkinson

La SN, qui est la plus grosse structure du mésencéphale, est divisée en deux parties : la partie compacte (SNc) et la partie réticulée (SNr). La SNr est une des deux structures de sortie des ganglions de la base et est composée principalement de neurones GABAergiques. La SNc est quant à elle composée des neurones DAergiques. Les dendrites des neurones de la SNc projettent profondément dans la SNr alors que les axones projettent majoritairement sur le striatum (Juraska *et al.*, 1977) avec des collatérales diffuses projetant sur d'autres structures extrastriales (Smith and Villalba, 2008). La DA libérée permet de moduler l'activité des structures cibles via des récepteurs DAergiques mais aussi d'exercer un rétrocontrôle inhibiteur sur la SNc.

La dégénérescence des neurones DAergiques de la SNc est communément admise comme la cause principale de la maladie de Parkinson. Les symptômes moteurs apparaissent après 70% à 80% de dégénérescence DAergique (McNamara and Durso, 2006). Les neurones DAergiques de

la voie nigro-striée qui projettent sur les parties « motrices » (dorso-latérales) du striatum sont davantage affectés que ceux qui projettent sur les zones plus « cognitives » (ventrales) (Agid, 1991), mais les autres structures des ganglions de la base sont aussi affectées (Hornykiewicz, 1973).

II.2. Système noradrénergique et Locus Cœruleus

II.2.1. Généralités

(Pour revue, Delaville et al., 2011). Deux systèmes noradrénergiques principaux peuvent être distingués: un composé de neurones appartenant à la medulla oblongata (noyaux A1/C1) et un plus rostral, composé de neurones localisés dans le pons, les noyaux A2/C2 (Gaspar, 1994). Le système le plus rostral, qui nous intéresse plus particulièrement, est principalement représenté par le locus cœruleus (LC, A6) et innerve majoritairement les structures ascendantes du cerveau (Aston-Jones, 2004).

II.2.2. Locus Cœruleus

a) Anatomie du LC

Le LC est présent dans toutes les espèces de mammifères et est la principale source de NA du système nerveux central (Aston-Jones, 2004; Mann, 1983). Son activité est influencée par de nombreuses afférences synaptiques. En raison de sa petite taille, les études biochimiques ne peuvent pas différencier le LC des structures avoisinantes. Cependant les études de traçage antérograde et rétrograde ont permis de déterminer les nombreuses afférences et éfferences de cette structure (Aston-Jones, 2004; Benarroch, 2009). Les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur pourvoient la source glutamatergique principale, le raphé dorsal (RD) module l'activité du LC en libérant de la 5-HT et l'aire préoptique inhibe l'activité de cette structure via la libération de GABA. Via ces projections dispersées, le LC module l'activité corticale, sous corticale mais aussi du tronc cérébral. Cependant, le striatum et la moelle épinière sont peu innervés par le LC. La figure 2 illustre les éfferences majoritaires de cette structure.

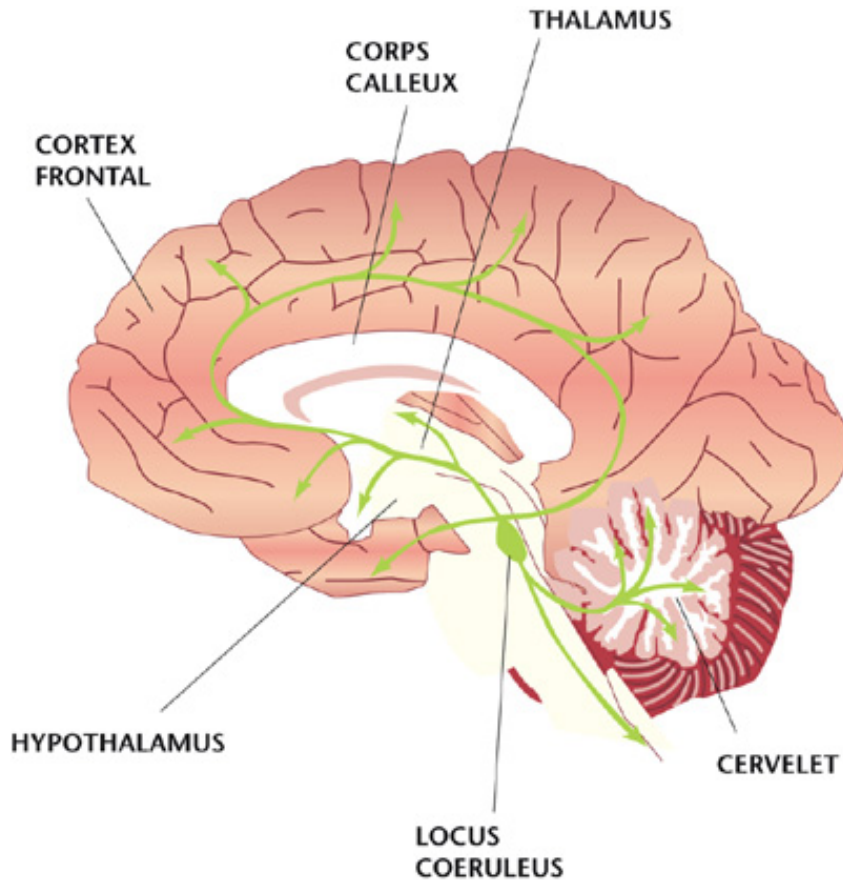


Figure 2: Représentation schématique des voies NAergiques issues du LC. Le locus coeruleus, principale source de NA du cerveau, innerve majoritairement les structures ascendantes au cerveau : cortex, hippocampe, thalamus, NST, VTA, SN, amygdale, mais aussi cervelet.

b) Rôles physiologiques et dérégulation du Locus Coeruleus

Le système NAergique issu du LC contribue au fonctionnement de plusieurs fonctions physiologiques en modulant la plasticité synaptique. Il permet entre autres une modulation de la douleur, de l'homéostasie et du flux sanguin local (McCormick, 1992). De plus, le LC joue un rôle clé dans l'éveil, l'attention et les réponses aux stress (Aston-Jones and Cohen, 2005; Berridge and Waterhouse, 2003).

La dérégulation du LC est impliquée dans beaucoup de pathologies telles que les maladies du sommeil et de l'éveil, les déficits attentionnels, l'hyperactivité, le stress post-traumatique et les

maladies psychiatriques comme l'anxiété, la dépression, la schizophrénie et l'addiction aux opioïdes (Benarroch, 2009).

II.2.3. Noradrénaline: implications pathologiques

a) LC et maladie de Parkinson

Le LC est souvent sévèrement affecté dans les maladies neurodégénératives (Saper *et al.*, 1991) et un nombre croissant d'études anatomiques et biochimiques a prouvé la dégénérescence de ses neurones dans la maladie de Parkinson. En plus d'une perte drastique des corps cellulaires NAergiques du LC (Chan-Palay and Asan, 1989), une diminution sévère des taux de NA (>80%) a été montrée dans les cerveaux de patients parkinsoniens (Taquet *et al.*, 1982 ; Jenner *et al.*, 1983 ; Gaspar *et al.*, 1991 ; Bertrand *et al.*, 1997 ; Ehringer and Hornykiewicz, 1960, 1998 ; German *et al.*, 1992 ; Greenfield and Bosanquet, 1953 ; Tohgi *et al.*, 1997). Cette forte déplétion NAergique serait en accord avec la théorie de Braak (Braak et Del Tredici, 2008) qui postule une altération caudo-rostrale des centres monoaminergiques dans la maladie de Parkinson avec une dégénérescence des neurones du LC avant la dégénérescence des neurones DAergiques de la SNc. De plus, des études de tomographie par émission de positron (TEP) ont mis en évidence que le [¹¹C]RTI-32, un marqueur *in vivo* des transporteurs DAergique et NAergique, est réduit dans plusieurs régions cérébrales des patients parkinsoniens y compris des structures pauvrement innervées en DA mais riche en NA (Marie *et al.*, 1995; Remy *et al.*, 2005). Il a aussi été montré un changement dans la forme et la taille des synapses NAergiques, aussi bien au niveau pré-synaptique que post-synaptique. Ainsi, un polymorphisme des vésicules synaptiques et une altération des mitochondries ont pu être mis en évidence (Chan-Palay and Asan, 1989; Baloyannis *et al.*, 2006).

Au vu de ces données, il semble donc évident que la dégénérescence des neurones NAergiques du LC joue un rôle important dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et pourraient être impliquée aussi bien dans la manifestation des symptômes moteurs et non-moteurs que dans la réponse thérapeutique à la L-Dopa.

b) Noradrénaline et symptômes Parkinsoniens

La maladie de Parkinson présente un large spectre de symptômes moteurs lorsque les deux systèmes DAergiques et NAergiques sont lésés (Narabayashi *et al.*, 1991). L'agoniste adrénergique $\alpha 2$ potentialise l'action du traitement à la L-Dopa (Hill et Brotchie, 1999). Il est également suggéré que les mécanismes alpha-adrénergiques et les récepteurs $\alpha 2$ en particulier, peuvent être impliqués dans les tremblements et la rigidité provoqués par la réserpine (Colpaert, 1987). Chez l'homme, l'akathisie et les tremblements pseudo-parkinsoniens sont modulés par une voie NAergique qui projette du LC vers le système limbique (Wilbur *et al.*, 1988). Ces symptômes sont améliorés par un agoniste des récepteurs $\alpha 2$ ou un antagoniste des récepteurs adrénergiques β (Wilbur *et al.*, 1988). Plusieurs études ont également montré l'implication de la voie NAergique du LC dans le phénomène de freezing (Mizuno *et al.*, 1994 ; Sandyk, 1996 ; Ringendahl et Sierla., 1997 ; Devos *et al.*, 2010), le phénomène "on-off" (Sandyk, 1996), l'instabilité posturale (Narabayashi *et al.*, 1991), et l'akinésie (Hornykiewicz, 1975 ; Narabayashi *et al.*, 1991).

L'amélioration de médicaments pour traiter les symptômes moteurs a mis en évidence les symptômes non moteurs, qui représentent l'une des principales préoccupations des études précliniques et cliniques (Chaudhuri et Odin, 2010). Alors que les efforts sont concentrés sur les sources DAergiques potentielles des dysfonctionnements mentaux chez les patients, le rôle potentiel du système NAergique doit être gardé à l'esprit. En effet, la perte spécifique de l'innervation DAergique et NAergique du système limbique est associée à des problèmes cognitifs et neurocomportementaux, y compris la démence (Cash *et al.*, 1987), la dépression (Cummings, 1992 ; Remy *et al.*, 2005) l'anxiété (Stein *et al.*, 1990 ; Lauterbach *et al.*, 2003) et les déficits de l'attention (Riekkinen *et al.*, 1998).

II.3. Système sérotoninergique et Raphé Dorsal

II.3.1. Généralités

La 5-HT est impliquée dans la plupart des fonctions cérébrales. Elle provient des neurones du raphé. Il s'agit de 9 groupes de neurones situés dans le tronc cérébral. Ils projettent très largement dans tout le système nerveux central. Les noyaux les plus rostraux innervent le cortex et le thalamus, les plus caudaux, le cervelet et la moelle épinière (figure 3).

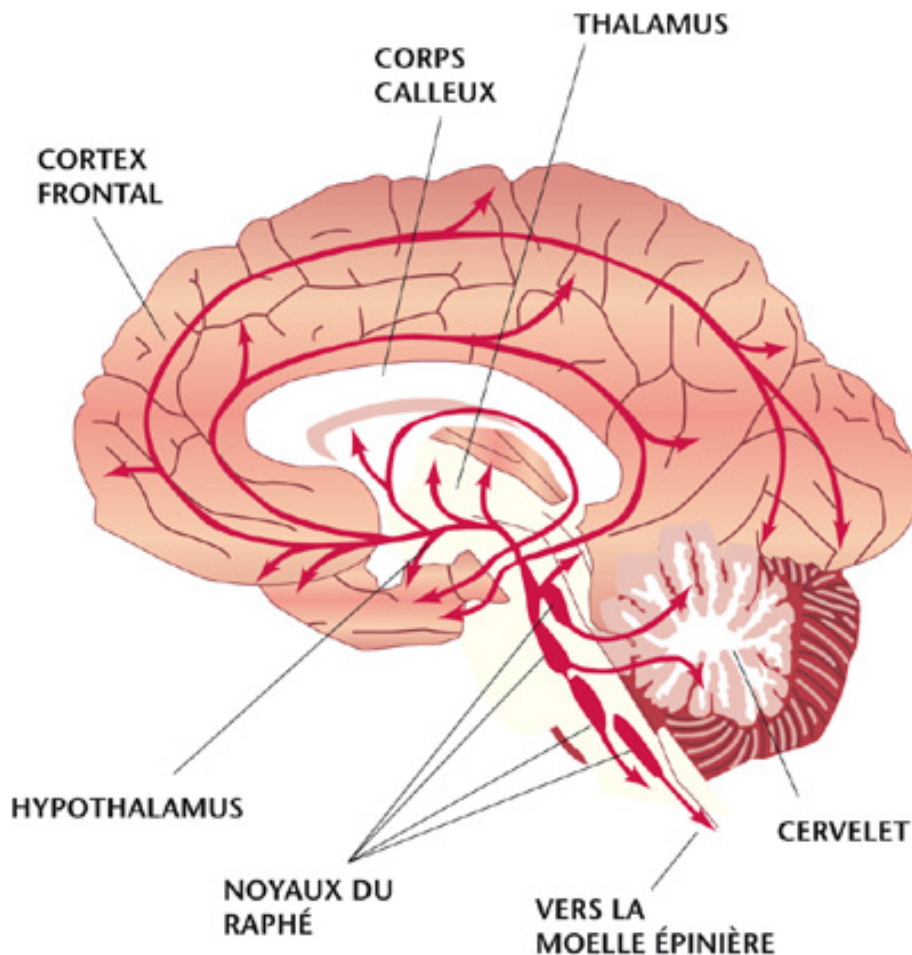


Figure 3: Représentation schématique des voies 5-HTergiques centrales. Les noyaux rostraux sont constitués entre autres du raphé dorsal et médian alors que les noyaux caudaux sont constitués du raphé caudal. Les noyaux rostraux innervent tout le système nerveux central alors que les noyaux caudaux innervent la moelle épinière.

Bien que surtout étudiée pour son implication dans des pathologies psychiatriques telles que la dépression et la schizophrénie, la 5-HT est aussi impliquée dans les pathologies motrices notamment en raison de son innervation importante des ganglions de la base. Celle-ci est issue plus particulièrement des noyaux du raphé dorsal (RD) et médian (RM) (Dray, 1981). Six faisceaux de fibres proviennent de ces noyaux, les fibres innervant les ganglions de la base empruntent majoritairement le faisceau médian du télencéphale. Un faisceau de fibres distinct et provenant du RD est responsable d'une innervation spécifique du cortex et des ganglions de la base (Azmitia et Segal, 1978).

II.3.2. Anatomie du Raphé Dorsal

Le RD est le plus volumineux des noyaux 5-HTergiques du raphé et contient la moitié des neurones 5-HTergiques du raphé (De Deurwaerdère, 2011). Seulement 50% des neurones du RD sont 5-HT (Descarries *et al.*, 1982 ; De Deurwaerdère, 2011 ; Jacobs et Azmitia, 1992). Ce noyau est responsable d'une innervation diffuse et non homogène de toutes les structures des ganglions de la base (Descarries *et al.*, 1990 ; Parent *et al.*, 2011 ; Steinbusch, 1981). L'innervation 5-HTergique est plus dense dans les structures caudales des ganglions de la base, notamment dans la SN, et dans les parties médianes et ventrales du striatum (noyau accumbens versus striatum) (Steinbusch, 1981 ; De Deurwaerdère, 2011). Certains neurones issus de la partie dorsale du RD et projetant dans le striatum envoient des collatérales dans la SN (Van der Kooy et Hattori, 1980a). Les corps cellulaires DAergiques reçoivent des afférences importantes du RD et du RM (Dray, 1981; Loughflin et Fallon, 1982; Vertes et Martin, 1988). Au niveau du GP, les différentes parties (internes et externes) reçoivent une innervation massive du RD (Azmitia et Segal, 1978 ; Lavoie et Parent, 1990).

II.3.3. Sérotonine: rôles physiologiques et implications pathologiques

a) Rôles physiologiques et dérégulation du Raphé Dorsal

La 5-HT est impliquée dans la régulation de fonctions telles que la thermorégulation, les

comportements alimentaires et sexuels, le cycle veille-sommeil, la nociception, l'anxiété ou le contrôle moteur. L'activité des neurones du raphé est liée au cycle veille-sommeil. De plus, la fréquence des influx nerveux en provenance du RD est corrélée à l'activité motrice, ce qui suggère que la quantité de 5-HT libérée dans le système nerveux central est augmentée avec l'activité motrice (Mignon and Wolf, 2002 ; Di Matteo *et al.*, 2008).

La désorganisation de l'activité du RD est impliquée dans diverses pathologies cognitives allant de la dépression aux troubles du comportement au sens large en évoquant la schizophrénie (Iqbal et van Praag, 1995 ; Meltzer et Huang, 2008), la maladie de Parkinson (Fox *et al.*, 2008 ; Nicholson et Brotchie, 2002), les addictions aux drogues d'abus (Bubar et Cunningham, 2008 ; Fletcher *et al.*, 2008), les chorées (Cross *et al.*, 1988), la maladie de Gilles de la Tourette (Steeves et Fox, 2008), les troubles obsessionnels compulsifs ou les dyskinésies iatrogènes conséquentes à l'utilisation de médicaments antiparkinsoniens ou des antipsychotiques (Carta *et al.*, 2008 ; Fox *et al.*, 2008 ; Meltzer et Huang, 2008 ; Kapur et Remington, 1996 ; Nash et Melzer, 1991).

b) Raphé Dorsal et maladie de Parkinson

L'implication de la 5-HT dans la maladie de Parkinson a été évoquée depuis longtemps (Jenner *et al.*, 1983 ; Scatton *et al.*, 1983 ; Miyawaki *et al.*, 1997), mais la littérature existante n'offre pas une idée claire sur le devenir des neurones 5-HTergiques du raphé dans cette pathologie. En effet, certains auteurs ont rapporté de faibles baisses ou aucune modification dans le nombre des neurones 5-HTergiques du RD (Jellinger, 1987 ; Halliday *et al.*, 1990 ; Paulus and Jellinger, 1991 ; Kim *et al.*, 2003 ; Sawada *et al.*, 1985). D'autres auteurs ont toutefois montré qu'il existait des altérations des fibres ascendantes limitées aux terminaisons 5-HTergiques dans différentes régions cérébrales de patients parkinsoniens (Chase et Ng, 1972 ; Chase, 1974 ; Chinaglia *et al.*, 1993) pouvant se traduire par 60% de baisse tissulaire en 5-HT au niveau du cortex et dans les ganglions de la base (Scatton *et al.*, 1983 ; Birkmayer et Riederer, 1986 ; Birkmayer and Birkmayer, 1987). Contrairement à la baisse marquée des taux de DA dans le putamen, c'est le noyau caudé qui présente la plus forte baisse des marqueurs 5-HTergiques: 5-HT (-66%), 5-HIAA, le métabolite principal de la 5-HT (-42%), le transporteur 5-HT (-56%) et la tryptophane hydroxylase (-59%) (Kish *et al.*, 2008). Beaucoup d'études se sont focalisées sur le striatum, mais il semble que la baisse puisse être plus diffuse, comme le suggère des données obtenues par

imagerie cérébrale décrivant des baisses du transporteur 5-HTergique non seulement dans le noyau caudé et le putamen mais également dans le thalamus et les aires corticales frontales (Haapaniemi *et al.*, 2001 ; Kerenyi *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2003). Ainsi, l'altération des neurones 5-HTergiques serait présente dans la maladie de Parkinson et pourrait dépendre de l'état d'évolution de la maladie (Scholtissen *et al.*, 2006). Cette altération serait à prendre en compte toutefois pour ajuster une approche thérapeutique efficace, non seulement pour la pathologie motrice, mais aussi pour les pathologies associées telles que la dépression.

II.4. Interactions des trois systèmes monoaminergiques

Plusieurs études anatomiques ont montré des projections réciproques entre les neurones 5-HTergiques, DAergiques et NAergiques (Aston-Jones *et al.*, 1991 ; Kaehler *et al.*, 1999). D'un point de vue fonctionnel, il a été mis en évidence que, lorsque les neurones 5-HT du RD étaient lésés, la fréquence de décharge des neurones NAergique du LC augmentait d'environ 70% (Dremencov *et al.*, 2007; Haddjeri *et al.*, 1997; Reader *et al.*, 1986). De la même façon, la lésion des neurones NAergiques du LC induit une décharge irrégulière des neurones du RD (Svensson *et al.*, 1975). Le LC et le RD reçoivent une forte innervation DAergique (Beckstead *et al.*, 1979 ; Kalen *et al.*, 1988). L'administration d'agonistes DAergiques augmente la fréquence de décharge des neurones du RD (Aman *et al.*, 2007; Haj-Dahmane, 2001) et inhibe les neurones du LC (Elam *et al.*, 1986). A l'inverse, les neurones du LC et du RD modulent l'activité des neurones DAergiques (Di Mascio *et al.*, 1998 ; Grenhoff *et al.*, 1993 ; Grenhoff and Svensson, 1993 ; Linner *et al.*, 2001). Au niveau des ganglions de la base, tant les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT que la stimulation électrique du RD augmentent la libération striatale de DA *in vivo* ou le métabolisme DAergique *ex vivo* induits par l'halopéridol, un antagoniste non sélectif des récepteurs DAergiques (Bubar *et al.*, 2003 ; De Simoni *et al.*, 1987 ; Lucas *et al.*, 2000 ; Lucas and Spampinato, 2000 ; Waldmeier, 1979 ; Waldmeier and Delini-Stula, 1979). De la même façon, la stimulation du LC excite l'activité des neurones DAergiques innervant le striatum (Ponzio *et al.*, 1981). Ainsi, les trois systèmes monoaminergiques sont en interactions constante et modulent réciproquement leurs activités.

III. Symptômes et traitements

III.1. Symptômes moteurs

Les troubles moteurs associés à la maladie de Parkinson sont souvent qualifiés de symptômes cardinaux. Ils regroupent les quatre manifestations les plus courantes décrites chez les patients parkinsoniens.

Il s'agit tout d'abord de l'**akinésie** ou **bradykinésie**, qui correspondent respectivement à la difficulté d'initiation du mouvement et à la lenteur de son exécution. En d'autres termes, les mouvements volontaires se caractérisent par un défaut d'initiation avec apparition d'un délai significatif entre la volonté de réaliser le mouvement et l'exécution de ce mouvement. De plus, on observe une réduction de l'amplitude du mouvement appelée hypokinésie. Les activités de routines sont donc grandement perturbées même si les difficultés se repèrent surtout dans les mouvements complexes qui réclament la coordination de plusieurs membres ou des séquences de mouvements différents. En effet, tous les types de mouvements ne sont pas concernés, en particulier les mouvements réclamant de la précision et les mouvements semi-automatiques comme la marche ou l'écriture. Cependant, les troubles de la marche sont constants dans le cours évolutif de la maladie de Parkinson. Essentiellement constitués d'une akinésie dopa sensible et d'une diminution du ballant des bras en début de maladie, la marche se fait ensuite à petits pas avec une réduction de la longueur du pas et une limitation de la vitesse jusqu'à l'apparition de phénomènes paroxystiques rythmiques tels que le *freezing* (suspension brutale et involontaire de la marche) et la festination (Brusque augmentation de fréquence en parallèle à une diminution d'amplitude des cycles de marche). Les caractéristiques cinématiques des troubles de la marche dans la MP sont représentées par une diminution de la vitesse de marche, de la longueur du pas et une augmentation du temps de double appui. Morris et al. 1994a ont démontré que le déficit fondamental de la marche du patient parkinsonien correspond à un défaut de régulation interne de la longueur du pas, compensé par une augmentation relative de la cadence.

La **rigidité** est assimilée à une tension excessive des muscles ou hypertonie musculaire généralisée. Elle est continue et homogène et concerne la quasi-totalité des muscles avec une prédominance du versant fléchisseur sur le versant extenseur (Delwaide *et al.*, 1986). Elle crée

des douleurs musculaires et une sensation de raideur et contribue à la difficulté et à la rareté des mouvements. Elle s'observe aussi au repos dans la posture voutée en avant, tête baissée. En effet, la rigidité se concentre généralement le long de la colonne vertébrale et aux articulations.

Les **tremblements de repos** constituent, sans aucun doute, le symptôme le plus connu de la maladie de Parkinson. Il s'agit d'un tremblement lent et peu ample qui commence généralement de façon unilatérale; il prédomine au niveau des extrémités des membres supérieurs et cesse dès que la personne initie un mouvement.

L'**instabilité posturale** est une manifestation tardive de la maladie, qui survient après de nombreuses années d'évolution. Elle se manifeste par des troubles de l'équilibre qui provoquent des chutes de plus en plus fréquentes. Il s'agit probablement du symptôme le plus incommodant, puisque la mobilité est alors réduite et que la sécurité lors des déplacements est compromise. Si l'instabilité posturale apparaît très tôt, il y a une forte possibilité qu'elle soit symptomatique d'une autre maladie que la maladie de Parkinson classique, dite idiopathique.

III.2. Symptômes non-moteurs

La majorité des symptômes décrits chez le patient parkinsonien correspond à des symptômes moteurs. Cependant, les complications non motrices ont une place non négligeable au sein de cette pathologie car elles sont généralement les plus handicapantes pour le patient et contribuent fortement à une diminution de la qualité de vie (Schrug, 2004). Ces complications regroupent des désordres **cognitifs**, **psychiatriques**, ainsi que des **troubles concernant le système neuro-végétatif**.

En effet, on retrouve selon l'évolution de la maladie, selon les patients et à des intensités différentes, des troubles digestifs, urinaires, vasculaires, de la sexualité ou encore des organes des sens. Au niveau psychique, parmi les troubles les plus fréquents, on peut noter les **démences** présentes chez 30% des patients parkinsoniens. Leurs bases neurobiologiques ne sont pas encore connues, cependant les dégénérescences des voies DAergique, NAergiques et/ou cholinergiques semblent être impliquées (Apaydin *et al.*, 2002; Hurtig *et al.*, 2000). Parfois, les démences peuvent être accompagnées de **psychoses**, généralement caractérisées par des hallucinations visuelles (Goetz and Stebbins, 1995). Beaucoup de patients parkinsoniens présentent un

sentiment d'**anxiété** accru mais la complication non motrice considérée comme la plus commune est sans nul doute la **dépression** (Burn, 2002; Olanow *et al.*, 2001). Les traitements utilisés pour les dépressions sont ceux couramment utilisés chez les dépressifs non parkinsoniens, tels que les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT ou de la NA ou les antidépresseurs tricyclique (Burn, 2002 ; Richard *et al.*, 1997). L'origine de la dépression et de l'anxiété chez les patients PD fait encore l'objet de débats, mais la perturbation de l'interaction complexe entre les systèmes DAergiques, 5-HTergiques et NAergiques semble jouer un rôle important dans ces troubles (Aarsland *et al.*, 2011).

III.2.1. Anxiété

Entre un tiers et la moitié des Parkinsoniens souffrent d'anxiété souvent associée à un sentiment d'insécurité (Marsh, 2000 ; pour revue, Delaville *et al.*, 2011). L'anxiété est deux fois plus fréquente chez les patients parkinsoniens par rapport à la population générale. Le trouble anxieux est généralement associé aux complications motrices, notamment lors de l'état « off » après traitement à la L-Dopa (Witjas *et al.*, 2002).

Les facteurs de risque pour les troubles anxieux sont le sexe féminin, la présence de fluctuations motrices, et des antécédents de troubles anxieux (Leenjtens *et al.*, 2011). Elle est également plus fréquente chez les jeunes patients. L'anxiété peut être invalidante, car elle conduit à l'isolement social et l'agressivité.

L'anxiété est souvent présente longtemps avant l'apparition de la maladie, sous la forme d'une angoisse permanente, de période de panique, ou de phobie (Brown, 2011).

Anxiété et monoamines :

Bien que les mécanismes précis restent inconnus (Burn, 2002; Olanow *et al.*, 2001), les trois systèmes monoaminergiques seraient impliqués dans ces manifestations. En effet, plusieurs études cliniques suggèrent que l'anxiété serait liée à la dégénérescence des cellules dopaminergiques (Chaudhuri and Schapira, 2009) alors que d'autres études rapportent l'implication de la perte en noradrénaline et en sérotonine (Andrade *et al.*, 2004 ; for review, Graeff, 2002). Classiquement traitée par des benzodiazépines, l'anxiété est maintenant traitée

avec des thérapies de longue durée, notamment avec les médicaments sérotoninergiques également utilisés pour le traitement de la dépression (Olanow *et al.*, 2009). Par rapport aux benzodiazépines, les médicaments sérotoninergiques permettent une thérapie à long terme, sans induire de dépendance. L'anxiété liée à des fluctuations motrices est améliorée par l'adaptation de la dose de la levodopa, ce qui réduit les fluctuations motrices. Des thérapies complémentaires comme la psychothérapie sont également réalisées.

III.2.2. Dépression

La proportion de patients atteints de dépression est beaucoup plus élevée que la moyenne chez les patients parkinsoniens. La dépression peut consister en un trouble dépressif majeur (17%), un trouble dépressif mineur (22%) ou encore une dysthymie (trouble de l'humeur chronique) (13%) et ces symptômes dépressifs sont retrouvés chez 35% des patients (Reijnders *et al.*, 2008 ; Tan *et al.*, 2012). Les critères d'un épisode dépressif majeur sont décrits dans le DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder). Au moins cinq des symptômes suivants doivent avoir été présents pendant au moins deux semaines :

- Humeur dépressive présente pratiquement toute la journée, presque tous les jours, signalée par le sujet.
- Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir pour toutes ou presque toutes les activités, pratiquement toute la journée, presque tous les jours
- Perte ou gain de poids significatif en l'absence de régime, ou diminution ou augmentation de l'appétit presque tous les jours
- Insomnie ou hypersomnie presque tous les jours.
- Agitation ou ralentissement psychomoteur presque tous les jours.
- Fatigue ou perte d'énergie presque tous les jours.
- Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée (qui peut être délirante) presque tous les jours.
- Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision presque tous les jours.
- Pensées de mort récurrentes, idées suicidaires, récurrentes sans plan précis ou tentative de suicide ou plan précis pour se suicider.

La dépression est basée sur différents symptômes comme la sensation d'incapacité, la réduction des stimuli émotionnels, le manque de motivation et l'anhédonie (Loas *et al.*, 1995 ; Matsui *et al.*, 2013). L'anhédonie définie comme une réduction de la capacité à éprouver du plaisir physique ou sociale, est reportée comme l'un des symptômes primaires de dépression chez les patients parkinsoniens (Lemke, 2008). L'apathie se définit comme une altération des comportements liés à l'action caractérisée par une diminution des actions volontaires (Levy & Czernecki, 2006). Elle semble difficile à distinguer de la dépression, les deux étant souvent concomitantes, et ayant des symptômes communs comme la perte d'intérêt, le ralentissement psychomoteur, la perte d'énergie, l'hypersomnie et le retrait social. Cependant, il faut distinguer la dépression liée à l'annonce de la maladie ou les difficultés liées à la maladie et la dépression comme symptôme à proprement parlé qui apparaît souvent avant les troubles moteurs.

Dépression et monoamines :

Le système sérotoninergique est connu pour moduler l'humeur, les émotions, le sommeil et l'appétit. La pathophysiologie de la dépression chez les patients parkinsoniens pourrait être due à une neurotransmission sérotoninergique anormale avec le changement de récepteurs dans les régions limbiques (Fox *et al.*, 2006). Bien que la dépression chez les patients parkinsoniens soit couramment associée à un trouble sérotoninergique (Chung *et al.*, 2003 ; Politis and Niccolini, 2014), la modulation de l'interaction des systèmes NAergique et DAergique est également impliquée dans les troubles dépressifs (Remy *et al.*, 2005). En effet, des données de PET suggèrent que le système NAergique est d'une grande importance dans ce trouble et indique que les médicaments améliorant la neurotransmission NAergique seraient bénéfiques dans le traitement de la dépression chez les patients PD (Lemke, 2002; Devos *et al.*, 2008). Cependant ces données sont encore controversées (Weintraub *et al.*, 2010). En outre, les médicaments tels que le Pramipexole, un agoniste des récepteurs DAergiques D2/D3, ont montré des résultats prometteurs dans divers essais cliniques en réduisant les symptômes dépressifs chez les patients parkinsoniens par rapport à un placebo et ISRS (Barone *et al.*, 2011).

III.3. Traitements

La compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson et le développement des

modèles animaux ont permis de mettre au point plusieurs stratégies thérapeutiques. Il n'existe cependant pas de traitement curatif agissant sur le processus de neurodégénérescence à l'origine de la maladie, mais seulement des traitements symptomatiques soulageant essentiellement les troubles moteurs de la maladie. Deux types d'approches existent: une approche pharmacologique visant à compenser la déplétion DAergique dans le système nerveux central et une approche neurochirurgicale qui consiste en la stimulation électrique à haute fréquence du noyau sous-thalamique (NST).

II.3.1. Traitements pharmacologiques :

Les traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson visent surtout à rétablir la transmission DAergique altérée, par différentes méthodes dont la stimulation directe des récepteurs DAergiques (agonistes DAergiques). Ces agonistes agissent directement sur les récepteurs DAergiques mais peuvent entraîner des effets secondaires indésirables. On peut aussi potentialiser ces effets en inhibant la dégradation de la DA résiduelle (inhibiteurs enzymatiques de la MAO B). Cependant, ces substances sont moins efficaces sur les symptômes moteurs que le traitement de référence: la L-Dopa. Cette molécule est le précurseur de la synthèse de DA. La L-Dopa, couplée à un inhibiteur de la décarboxylase périphérique ou de la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) permet de rétablir les taux de DA circulant. Cependant, la L-Dopa est aussi le précurseur de la NA et peut donc être métabolisée en NA par les neurones issus du LC (figure 4). Ce traitement pharmacologique est efficace à court et moyen terme sur la triade symptomatique motrice « tremblement-rigidité-akinésie ». Classiquement, on décrit trois étapes du traitement à la L-Dopa de la maladie de Parkinson. La première est appelée la **lune de miel**. C'est une période variant de 3 à 6 ans, qui se définit par une qualité de vie pratiquement normale. C'est la période de meilleure efficacité du traitement à la L-Dopa, pendant laquelle les symptômes sont améliorés de façon spectaculaire. Cette étape est suivie par des périodes de **fluctuations et de complications motrices** affectant 60% des patients. La première fluctuation motrice est la détérioration de fin de dose (ou « wearing-off ») qui correspond à une perte d'efficacité du traitement à la L-Dopa, les symptômes moteurs réapparaissent donc plus rapidement. Des phénomènes de blocage-déblocage (ou « freezing ») sont également présents durant cette période. L'efficacité du traitement varie chez un même patient parallèlement à la disponibilité plasmatique du médicament. Si le taux est élevé, des périodes de dyskinésies

(mouvements anomaux involontaires) sont mises en évidences, et inversement, lorsque le taux chute, des périodes d'akinésie et de bradykinésie apparaissent. La troisième période, la plus handicapante, correspond à la **perte d'efficacité quasi-totale de la L-Dopa** et à l'apparition de signes non sensibles à la L-Dopa.

En plus des effets sur le comportement moteur, la L-Dopa a également des effets sur les troubles non moteurs tels que l'anxiété ou la dépression mais ses effets sont controversés. En effet, la dépression, l'anxiété et l'apathie qui semblent être en partie liées à la transmission hypodopaminergique (Thobois *et al.*, 2010) seraient améliorées par le traitement à la L-Dopa (Rahman *et al.*, 2014). D'autres études suggèrent une apparition d'épisode de panique suite à la prise de L-Dopa (Vasquez *et al.*, 1993) ainsi que des fluctuations de l'humeur et de l'anxiété liées au dosage (Friedenberg et Cummings, 1989 ; Maricle *et al.*, 1995b ; Richard *et al.*, 2005). En effet, en plus d'être convertie en DA dans les neurones DAergiques, la L-Dopa est également convertie par les neurones 5-HTergiques (Navailles et al., 2010a).

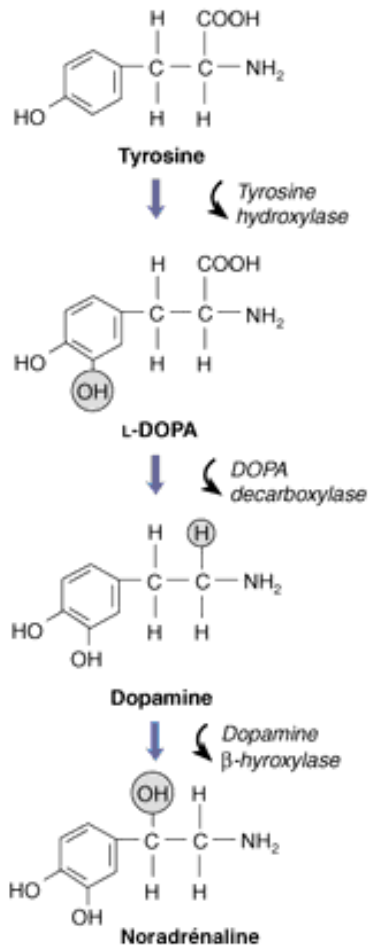


Figure 4: Voie de synthèse de la dopamine et de la noradrénaline. La L-Dopa exogène remplace la L-Dopa manquante et est transformée en dopamine par la dopa decarboxylase des neurones dopaminergiques restants et en noradrénaline dans les neurones noradrénergiques.

II.3.2. Traitement chirurgical: stimulation à haute fréquence (SHF) du noyau sous thalamique (NST)

La SHF du NST améliore l'ensemble des symptômes moteurs majeurs de la maladie de Parkinson (Benazzouz *et al.*, 1993; Limousin *et al.*, 1998; Limousin *et al.*, 1995). Cette amélioration de la fonction motrice permet une diminution importante de la médication antiparkinsonienne (de l'ordre de 50 à 80% de la dose journalière) et même, chez un bon nombre de patients, l'arrêt total des médicaments DAergiques (Moro and Albanese, 1999 ; Vingerhoets *et al.*, 2002).

En 1993, Benazzouz et collaborateurs, ont remplacé la lésion du NST par sa SHF chez le singe MPTP, afin d'éviter l'apparition d'effets non désirables et irréversibles, comme les mouvements anormaux involontaires décrits lors de lésion du NST (Aziz *et al.*, 1991; Bergman *et al.*, 1990). Cette approche de stimulation était déjà connue pour induire des effets réversibles, graduels et contrôlables sur les troubles fonctionnels, en particulier pour le traitement des tremblements (Benabid *et al.*, 1991; Benabid *et al.*, 1987). L'akinésie et la rigidité sont abolies par la SHF du NST chez le singe rendu hémiparkinsonien par l'injection intra-carotidienne unilatérale de MPTP (Benazzouz *et al.*, 1996; Benazzouz *et al.*, 1993). Ces effets bénéfiques obtenus chez le modèle animal de la maladie de Parkinson ont conduit à proposer la SHF du NST comme traitement thérapeutique chez des patients parkinsoniens (Benabid *et al.*, 1994; Pollak, 1995). La SHF du NST unilatérale et bilatérale améliore de façon spectaculaire les principaux troubles moteurs de la maladie de Parkinson : l'akinésie, la rigidité, les troubles de la posture et même les tremblements de repos (Limousin *et al.*, 1995 ; Pollak *et al.*, 1996).

A long terme (5 ans), les bénéfices de la SHF du NST sont préservés, particulièrement en ce qui concerne le tremblement et la rigidité (Krack *et al.*, 2003) même si les bénéfices moteurs peuvent légèrement diminuer avec la progression de la maladie (Fasano *et al.*, 2010). En plus de ces effets moteurs, le suivi régulier des patients opérés par SHF a révélé des modifications thymiques et comportementales nécessitant un suivi rapproché. Bien que présentant un avantage clinique évident dû à la réduction importante des effets secondaires induits par les traitements médicamenteux, la SHF nécessite l'implantation d'appareils de stimulation, amenant un certain risque infectieux, et des réglages fréquents par une équipe entraînée. De plus, d'autres effets

secondaires comme l'apparition de troubles compulsifs et l'augmentation de la dépression ont été mis en évidence dans les premières études bien que non expliqués. En effet, la SHF dans le NST pourrait provoquer, chez certains patients, des complications neuropsychiatriques, comme l'anxiété et la dépression (Temel *et al.*, 2006, Voon *et al.*, 2008). Cependant, de précédentes études cliniques montrent que la SHF dans le NST exerce des effets positifs sur les troubles de l'humeur (Eisenstein *et al.*, 2014 ; Campbell *et al.*, 2012 ; Czernecki *et al.*, 2005 ; Funkiewiez *et al.*, 2004 ; Schneider *et al.*, 2003).

IV. Ganglions de la base

IV.1. Organisation anatomo-fonctionnelle

La motricité volontaire est essentiellement un phénomène d'origine corticale. Elle fait intervenir le cortex moteur primaire, l'aire prémotrice, l'aire motrice supplémentaire, ainsi que les cortex associatifs préfrontaux et pariétaux (figure 5). L'activité de ces aires corticales est régulée par un ensemble de boucles cortico-sous-corticales où interviennent les ganglions de la base (Gerfen *et al.*, 1990).

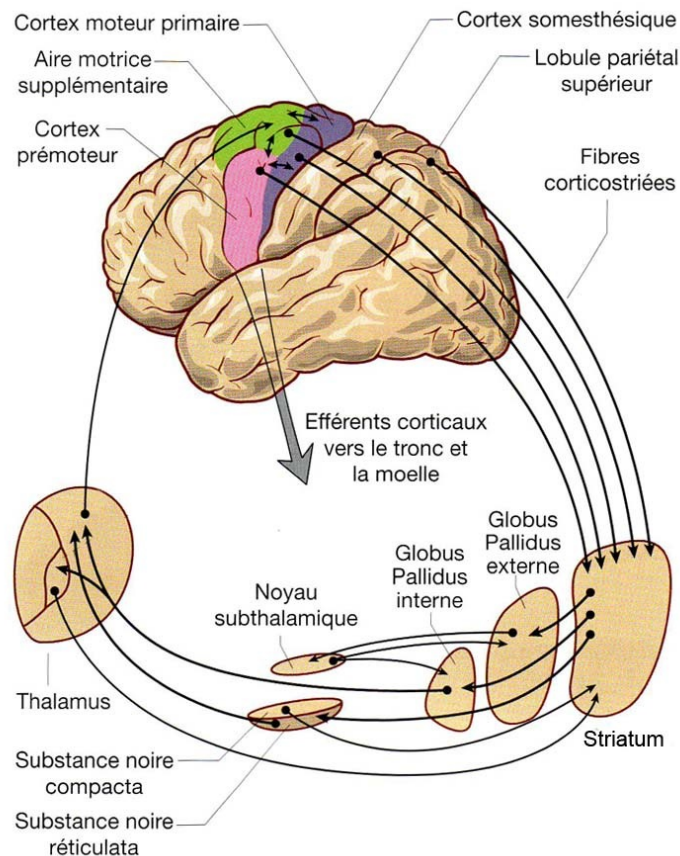


Figure 5: Représentation schématique de la boucle cortico-sous-corticale du circuit moteur, faisant intervenir les ganglions de la base. (D'après Graybiel *et al.*, 1990)

D'après le modèle anatomo-fonctionnel classiquement admis des ganglions de la base (Albin *et al.*, 1989; Alexander and Crutcher, 1990; Alexander *et al.*, 1990), le striatum représente la structure d'entrée principale de l'information en provenance de plusieurs régions corticales. La SNr et le globus pallidus interne (GPi, équivalent du noyau entopédunculaire chez le rongeur) sont les structures de sortie, projetant principalement sur les noyaux moteurs du thalamus. Les structures d'entrée et de sortie du réseau sont liées soit par une voie directe monosynaptique, soit par une voie indirecte polysynaptique faisant relais au niveau du globus pallidus externe (GPe, équivalent du GP chez le rongeur) et du NST (Burkhardt *et al.*, 2007) (cf. figure 5). La voie directe a pour origine les neurones GABAergiques épineux de taille moyenne (MSNs, medium spiny neurons) du striatum projetant sur la SNr et le GPi et co-exprimant la substance P (Bolam and Smith, 1990). Les MSNs projetant sur le GPe co-expriment quant à eux l'énképhaline (Gerfen *et al.*, 1990). L'activation de la voie directe faciliterait le mouvement en désinhibant les neurones thalamo-corticaux, alors que l'activation de la voie indirecte inhiberait le mouvement en renforçant l'inhibition de cette même voie (Garcia-Cairasco *et al.*, 1997). L'équilibre entre ces deux voies est assuré par l'innervation DAergique striatale issue de la SNc qui est fortement endommagée chez les patients parkinsoniens (figure 6). La perte en DA dans la SNc va alors altérer l'organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base et donc la réalisation de l'acte moteur, notamment via le NST, seule structure glutamatergique des ganglions de la base et donc considérée comme la « driving force » de cet ensemble de structures.

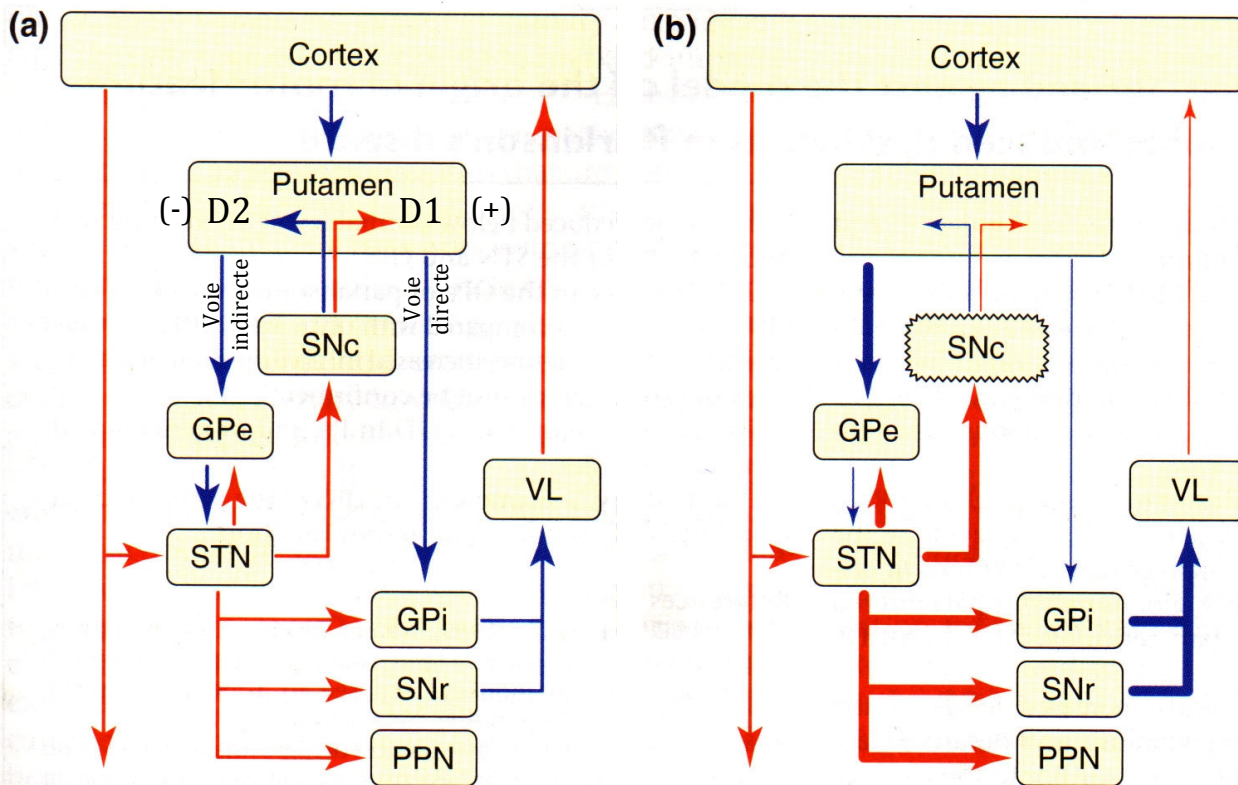


Figure 6: Représentation schématique anatomo-fonctionnelle du circuit moteur impliquant le cortex, les ganglions de la base et le thalamus chez a) le sujet sain et b) chez le patient parkinsonien

GPe et GPi (globus pallidus externe et interne) ; STN (noyau sous-thalamique) ; SNc et SNr (substance noire compacte et réticulée) ; VL : Thalamus ; PPN : noyau entopédonculaire. Flèches bleues : inhibitions GABAergiques; flèches rouges: excitations glutamatergiques. D'après Albin et al. (1986), Alexander & Crutcher, (1990).

IV.2. Le noyau sous-thalamique: plaque tournante des ganglions de la base.

IV.2.1. Considérations anatomiques du NST

Le NST est l'un des plus petits noyaux des ganglions de la base. L'utilisation de techniques modernes de traçage a permis de mettre en évidence que le NST est bien plus qu'un simple relais de la transmission pallidale. En effet, le NST envoie et reçoit des projections de la quasi-totalité des noyaux du réseau. De plus, il est la seule structure glutamatergique des ganglions de la base et exerce une influence excitatrice sur les structures de sortie du système, le GPi et la SNr.

Afférences

Bien que le striatum soit communément considéré comme la principale structure d'entrée de l'information corticale du circuit des ganglions de la base, le NST reçoit des projections importantes en provenance des cortex oro-faciale et pré-moteur (Afsharpour, 1985 ; Canteras *et al.*, 1990 ; Degos *et al.*, 2008 ; Kitai and Deniau, 1981). De plus, il existe des projections massives du GPe qui innervent la quasi-totalité du NST (Parent and Hazrati, 1995). Ce sont les principales afférences GABAergiques (Fonnum *et al.*, 1978; Oertel and Mugnaini, 1984; Smith and Parent, 1988; Smith *et al.*, 1987).

Le NST établit également un lien réciproque avec la SNc (Berendse and Groenewegen, 1990 ; Hassani *et al.*, 1997 ; Kita and Kitai, 1987 ; Mintz *et al.*, 1986). Cependant, il n'existe pas d'organisation topographique claire de cette projection (Hassani *et al.*, 1997). En plus des projections mentionnées précédemment, d'autres régions innervent le NST chez le rongeur, comme le locus coeruleus (Canteras *et al.*, 1990 ; Pifl *et al.*, 1991) et le raphé dorsal (Wallman *et al.*, 2011).

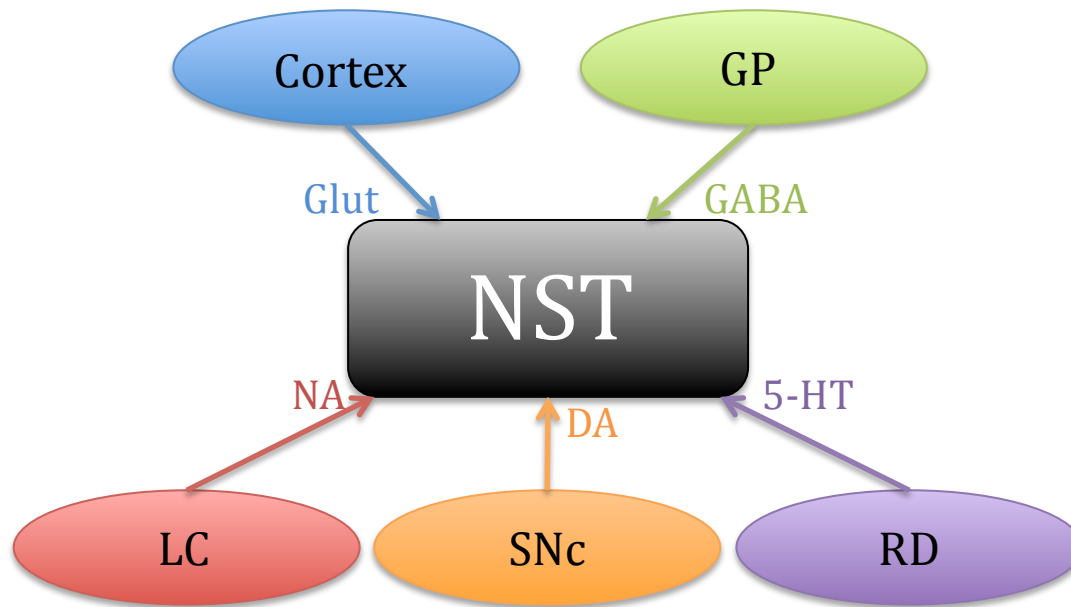


Figure 7: Représentation schématique des afférences majeures et neuromodulatrices du NST, chez le rat. GP : globus pallidus ; NST : noyau sous-thalamique ; LC : Locus coeruleus ; SNC : substance noire *pars compacta* ; RD : raphe dorsal ; Glut : glutamate ; NA : noradrénaline ; DA : dopamine ; 5-HT : sérotonine.

Peu de données sont disponibles quant à l'impact des monoamines sur l'activité du NST. Cependant, le NST exprime des récepteurs DAergiques (Savasta *et al.*, 1986), NAergiques et 5-HTergiques pré- et post-synaptiques (Belujon *et al.*, 2007 ; Delaville *et al.*, 2012b ; Steinbusch, 1981), et des études électrophysiologiques *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'il existe une modulation par les trois monoamines de l'activité des neurones du NST (Arcos *et al.*, 2003 ; Baufreton *et al.*, 2005 ; Belujon *et al.*, 2007 ; Wallman *et al.*, 2011). Ainsi ces afférences dites mineures pourraient avoir une importance fonctionnelle à ne pas négliger.

Efférences

Le NST projette majoritairement sur les structures de sortie des ganglions de la base, la SNr et le GPi, mais il projette également sur le GPe (Smith *et al.*, 1998). Chez le rat, les neurones du NST présentent un grand nombre de collatérales (Van Der Kooy and Hattori, 1980). Des marquages intracellulaires (Kita *et al.*, 1983), des données électrophysiologiques (Hammond and Yelnik, 1983), et des marquages utilisant des transporteurs multimodaux (Bevan *et al.*, 1994 ; Bolam and Smith, 1992) indiquent qu'un seul et même neurone du NST, projette à la fois sur le GPe, le GPi

et la SNr. D'autres projections vers le striatum (Beckstead, 1983 ; Kita and Kitai, 1987), la SNc (Groenewegen and Berendse, 1990 ; Kita and Kitai, 1987 ; Mintz *et al.*, 1986), le noyau pédonculopontin (Hammond and Yelnik, 1983 ; Kita and Kitai, 1987 ; Parent and Smith, 1987) et même la moelle épinière ont été décrites. Plus récemment, des données anatomiques et électrophysiologiques ont mis en évidence l'existence d'une boucle cortico-subthalamo-corticale mettant en jeu les cortex sensori-moteur et préfrontal (Degos *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces données nous amène à conclure sur la position anatomique centrale que tient le NST au sein du réseau des ganglions de la base.

IV.2.2. Considérations fonctionnelles du NST

Le rôle du NST comme acteur majeur du contrôle moteur est aujourd'hui indéniable. Son nom a longtemps été associé aux ballismes puisque des accidents vasculaires cérébraux dans la région du NST entraînent l'apparition de mouvements anormaux involontaires (Whittier, 1947). Ces mouvements anormaux involontaires ont pu être reproduits chez le primate non-humain en inactivant le NST par des injections localisées d'agonistes des récepteurs GABA ou après lésion du noyau (Crossman *et al.*, 1984 ; Hammond *et al.*, 1979 ; Whittier, 1947 ; Whittier and Mettler, 1949).

De nombreuses études ont mis en évidence son implication dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. L'existence de modèles animaux de la maladie a permis une extension considérable des investigations consacrées aux conséquences fonctionnelles de la dégénérescence DAergique de la voie nigro-striée. L'administration intra-cérébrale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rongeur ou l'administration systémique de 1-Méthyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) chez le primate non-humain est à l'origine d'un grand nombre de perturbations fonctionnelles du réseau des ganglions de la base. Les altérations les plus marquantes sont sans doute l'hyperactivité du NST et de ses cibles, tant au niveau électrophysiologique (Bergman *et al.*, 1994 ; Kreiss *et al.*, 1997 ; Ni *et al.*, 2001) que métabolique (Benazzouz *et al.*, 2004 ; Blandini *et al.*, 1997 ; Salin *et al.*, 2003 ; Vila *et al.*, 1996 ; Vila *et al.*, 1999).

D'un point de vue électrophysiologique, l'augmentation de la proportion des neurones capables

de décharger en bouffées de potentiels d'actions, également appelées « bursts », a été constatée (Bergman *et al.*, 1994 ; Hassani *et al.*, 1996 ; Ni *et al.*, 2001 ; Vila *et al.*, 2000). La signification physiopathologique de l'émergence de bouffées, est soutenue par des données montrant une forte augmentation de la libération de neurotransmetteurs après stimulation par des bouffées, en comparaison avec une stimulation régulière à la même fréquence de décharge (Dutton and Dyball, 1979 ; Gonon, 1988 ; Lisman, 1997 ; Lundberg *et al.*, 1986). D'un point de vue fonctionnel, le mode de décharge en bouffée est plus « efficace » que le mode de décharge régulier (Bergman *et al.*, 1994).

V. Structures limbiques impliquées dans les troubles non-moteurs de la maladie

V.1. Amygdale

V.1.1. Considérations anatomiques de l'amygdale

L'amygdale, décrite pour la première fois dans le cerveau humain comme une masse en forme d'amande composée de substance grise située dans le lobe temporal antérieur, est reconnue depuis longtemps comme un élément clé dans les circuits de l'émotion (LeDoux, 2007), en particulier l'anxiété et les stimuli liés à la peur.

L'amygdale peut être subdivisée en différentes régions, noyaux et sous-noyaux : une amygdale superficielle comprenant un noyau médian et en avant du cortex, le noyau latéral du tractus olfactif et le noyau corticale postérieur ou cortex periamygdaloïde, et une amygdale profonde constituée de la latérale, la basolatérale (BLA) (McDonald, 1992) et la basomédiale (Alheid *et al.*, 2003). En plus des noyaux superficiels et profonds, le noyau central (CeA) se trouve dans la partie dorsale de l'amygdale adjacente à la jonction de la strie terminale. Ici, nous ciblerons plus précisément le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) qui, au regard de son innervation, semble directement impliqué dans les troubles anxieux.

V.1.2. Innervation

Le BLA est composé de cellules principales glutamatergiques et d'interneurones

GABAergiques. Les interneurons ne représentent que 15% de la population neuronale totale du BLA (McDonald, 1982, 1992) mais déterminent l'état d'excitabilité des neurones principaux (Rainnie *et al.*, 1991b ; Gean et Chang, 1992 ; Smith et Dudek, 1996 ; Mahanty et Sah, 1998 ; Rainnie, 1999). En effet, ils présentent une vaste arborisation axonale, qui forment des synapses avec le soma des neurones de projection qui leur permet d'exercer une modulation puissante sur les neurones (McDonald *et al.*, 1989). Ils ont un rôle capital dans la régulation des comportements ainsi qu'un rôle spécifique dans des pathologies comme l'épilepsie et l'expression des comportements d'anxiété.

Les projections afférentes régulent l'activité des neurones de projection via les synapses avec les dendrites des neurones de projection et les interneurons dans la BLA. En effet, les informations entrantes sont traitées dans la BLA et ensuite transférées vers le CeA qui permet de produire l'émotion de peur appropriée.

La BLA reçoit une innervation dense des terminaisons DAergiques de l'ATV et de la SNc, et exprime à la fois les récepteurs D1 et D2 (Scibilia *et al.*, 1992). Cette structure reçoit également une innervation NAergique du LC même si la plus dense innervation issue du LC projette sur la CeA de l'amygdale (Fallon *et al.*, 1978). Une étude par microdialyse a montré que le niveau de NA dans l'amygdale augmente en réponse à une situation de stress (Tanaka *et al.*, 1991; Khoshbouei *et al.*, 2002). De plus, des rongeurs aux primates, la BLA reçoit une innervation 5-HTergique dense (pour revue, Asan, 2013) principalement du RD (Halberstadt et Balaban, 2006 ; Ma *et al.*, 1991), tandis que les afférences provenant du raphé médian (RM) sont rares (Vertes *et al.*, 1999). Des études d'imagerie fonctionnelle s'intéressant aux changements dans l'activité de l'amygdale après la manipulation pharmacologique des sous-systèmes 5-HTergiques chez des volontaires sains ont démontré l'implication de la transmission 5-HTergique dans l'amygdale dans la régulation des émotions chez l'homme (Cools *et al.*, 2005 ; Norbury *et al.*, 2009).

V.1.3. Amygdale et anxiété

Une altération de l'activité de l'amygdale a été rapportée dans les troubles psychiatriques, en particulier ceux qui sont caractérisés par une anxiété accrue (Boll et al 2011 ; Levens *et al.*,

2011 ; Phelps et LeDoux 2005 ; Shin et Liberzon 2010 ; Simon *et al.*, 2006 ; Toyoda *et al.*, 2011 ; Vizueta *et al.*, 2012). En effet, L'amygdale joue un rôle essentiel dans la médiation des émotions telles que l'anxiété (Davis *et al.*, 1994 ; Wunderlich *et al.*, 2002 ; LeDoux, 2003 ; Rauch, 2003 ; Kalin *et al.*, 2004) et la BLA a été largement étudiée comme l'une des structures essentielles dans les circuits neuronaux pour le traitement des comportements liés à l'anxiété (Davis, 1998, Etkin *et al.*, 2004 ; Mitra, 2009). Des études lésionnelles et pharmacologiques ont indiqué que l'activation de la BLA augmente, tandis que son inhibition diminue, les réponses physiologiques et les comportementaux liés à l'anxiété (Sanders et Shekhar, 1995 ; Sajdyk et Shekhar, 1997 ; Truitt *et al.*, 2009). Plus précisément, une étude utilisant la technique d'optogénétique a montré que la stimulation des voies issues de la BLA vers la CeA latérale réduit les comportements liés à l'anxiété chez la souris alors que son inhibition l'augmente (Tye *et al.*, 2011) et, à l'inverse, la stimulation des voies issues de la BLA vers l'hippocampe ventral augmente les comportements liés à l'anxiété chez la souris alors que son inhibition les diminue (Felix-Ortiz *et al.*, 2013 ; Felix-Ortiz et Tye, 2014). En outre, les enregistrements extracellulaires des neurones de la BLA chez des souris éveillées soumises à deux tests d'anxiété montrent qu'un groupe distinct de neurones du BLA affiche une évolution lente et caractéristique et augmente progressivement sa fréquence de décharge de façon directement corrélée au développement progressif des comportements d'anxiété mesurés grâce à l'Open field et au labyrinthe en croix surélevé (Wang *et al.*, 2011).

L'activité basale des neurones de projection est régulée par un équilibre entre la transmission GABAergique et glutamatergique (Rainnie *et al.*, 1991 ; Smith and Dudek, 1996). L'injection d'un agoniste du récepteur GABAA dans la BLA a montré que ce système est impliqué dans la pathogenèse de troubles liés à l'anxiété (Zhou *et al.*, 2010). En effet, le blocage de l'inhibition de la transmission GABAergique tonique qui existe dans la BLA entraîne la manifestation de l'anxiété (Sanders et Shekhar, 1995). La BLA reçoit également une innervation DAergique, NAergique et 5-HTergique impliquées dans l'étiologie et le traitement de la schizophrénie, la dépression et l'anxiété (Brown et Gershon, 1993; Wingerson *et al.*, 1996).

V.1.4. BLA et maladie de Parkinson

Dans un modèle de rat ayant subi une lésion DAergique partielle bilatérale de la voie nigro-striée, (Chen *et al.*, 2011) ont observé une diminution de la fréquence de décharge des

neurones de projection dans la BLA, ce qui suggère que les voies DAergiques directes de l'ATV sur les neurones de projection de la BLA ou les neurones pyramidaux du cortex préfrontal médian peuvent jouer un rôle important dans la modulation de l'activité de décharge des neurones de projection dans la BLA de rats lésés. Chez les rats contrôles, la fréquence de décharge des neurones de projection ($> 2,5$ ms de durée du potentiel d'action) correspond à une moyenne de $0,23 \pm 0,02$ Hz tandis que chez les rats lésés, les neurones de projection ont une fréquence d'une moyenne de $0,17 \pm 0,01$ Hz (Chen *et al.*, 2011). Il a également été montré une diminution de la densité des fibres TH positives dans la BLA, le noyau latéral et central de l'amygdale chez des souris traitées au 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (von Bohlen und Halbach *et al.*, 2005), et que la dégénérescence des neurones DAergiques de la SNc produit une diminution spectaculaire de la DA et de ses principaux métabolites dans les zones de projection DAergiques notamment dans le BLA (Scatton *et al.*, 1983).

La maladie de Parkinson est également caractérisée par la perte en NA et bien que peu de données existent, des études d'imagerie ont montré que la confrontation à des stimuli émotionnels entraîne, chez les sujets, une augmentation de l'activation de l'amygdale dépendante de la NA (Van Stegeren *et al.*, 2008).

Pour finir, la maladie de Parkinson est caractérisée par une perte des neurones 5-HTergiques et des manipulations expérimentales de la transmission 5-HTergique dans l'amygdale altèrent le comportement anxieux chez les animaux (Bauman et Amaral, 2005 ; Christianson *et al.*, 2010 ; Hensler, 2006; Lowry *et al.*, 2005 ; Menard et Treit, 1999 ; Smith et Porrino, 2008). De même, le stress est associé à la transmission 5-HTergique dans l'amygdale (Amat *et al.*, 1998 ; Kawahara *et al.*, 1993 ; Rueter et Jacobs, 1996 ; Zanolini *et al.*, 2009), et le stress induit par un comportement anxieux chez des animaux peut être modulé par la manipulation pharmacologique ciblée de la transduction du signal 5-HTergique dans l'amygdale (Christianson *et al.*, 2010; Lowry *et al.*, 2005; Menard et Treit 1999).

En conclusion, l'amygdale, via son innervation DAergique, NAergique et 5-HTergique, joue un rôle dans les comportements d'anxiété que l'on retrouve dans la maladie de Parkinson. En effet, les sujets atteints de la maladie présentent une atrophie de l'amygdale (Bouchard *et al.*, 2008) et, plus précisément, les patients parkinsoniens déprimés ont montré des diminutions du

volume de l'amygdale comparativement au groupe témoin sain (Surdhar *et al.*, 2012).

V.2. Habenula

V.2.1. Considérations anatomiques de l'habenula

La variété des fonctions et des comportements biologiques dans lesquels l'habenula est impliquée, est morphologiquement traduite par son organisation subnucléaire complexe. Des analyses anatomiques détaillées chez les rongeurs ont révélé une division médiale et latérale comprenant au moins 10 sous-noyaux différents (Geisler *et al.*, 2003). L'importance fonctionnelle de certaines des entités anatomiques découvertes a été montrée à l'aide de données hodologiques et électrophysiologiques, qui montrent les connectivités afférentes et efférentes de chaque sous-noyau ainsi que les sous-noyaux spécifiques ciblés par une modulation DAergique (Kowski *et al.*, 2008, 2009).

La partie latérale de l'habenula (LHb) est connue pour réguler les comportements complexes tels que la cognition, l'attention, le traitement de la douleur, veille-sommeil rythme, et la réponse au stress (Sutherland, 1982; Klemm, 2004; Lecourtier et Kelly, 2007). Mais plus important encore, la LHb est impliquée dans le contrôle du comportement de motivation.

V.2.2. Innervation

a) Afférences et efférences

La LHb est principalement innervée par les ganglions de la base, en particulier le GP (Parent *et al.*, 1981; Rajakumar *et al.*, 1993), qui reçoit une afférence corticale par l'intermédiaire du striatum. Bien que la voie de sortie des ganglions de la base est principalement considérée comme inhibitrice, une étude a montré que la transmission issue des ganglions de la base vers la LHb est excitatrice, glutamatergique et supprimée par la 5-HT (Shabel *et al.*, 2012). Les neurones de la LHb reçoivent également des projections glutamatergiques d'autres structures qui comprennent l'hypothalamus latéral, le cortex et probablement l'ATV (Hnasko *et al.*, 2012 ; Shabel *et al.*, 2012) et une forte innervation GABAergique (Araki *et al.*, 1984), en provenance de projections éloignées (Smith *et al.*, 1987), mais aussi du GP médian (Shabel *et al.*, 2012). De

plus, les études anatomiques suggèrent que d'autres projections GABAergiques peuvent provenir de la bande diagonale de Broca, l'aire préoptique latérale, le noyau accumbens, la substantia innominata, et le striatum ventral (Geisler et Trimble, 2008).

Les axones provenant de la LHb atteignent les structures profondes via le faisceau retroflexus et innervent les neurones GABAergiques et DAergiques de l'ATV, les neurones GABAergiques et 5-HTergiques du RD et du RM, et les neurones GABAergiques du noyau tegmentale rostromédiale (RMTg ou queue-VTA; Barrot *et al.*, 2012). Cependant, des études de morphologie cellulaire indiquent également que certains neurones de la LHb peuvent projeter directement sur des neurones voisins dans la LHb, ce qui suggère un contrôle interne au sein de la structure.

b) Systèmes monoaminergiques

Dans le tronc cérébral, les efférences de la LHb visent principalement les noyaux contenant des neurones monoaminergiques: la zone DAergique de l'ATV et de la SNc, la partie 5-HTergique du RD et RM, et le tegmentum latérodorsal cholinergique.

Certains neurones DAergiques de l'ATV projettent également en retour vers la LHb suggérant que la DA peut moduler l'activité de la LHb (Phillipson et Pycock, 1982). En effet, la stimulation des structures DAergiques du mésencéphale comme l'ATV augmente la fréquence de décharge des neurones de la LHb chez les rats (Shen *et al.*, 2012), et l'activation DAergique excite les neurones de la LHb chez le rat *in vivo* (Kowski *et al.*, 2009). En revanche, les enregistrements *in vivo* montrent que dans les neurones de la LHb activés par un stimulus douloureux, la stimulation de l'ATV et de la SNc inhibe la fréquence de décharge de 90% des neurones de la LHb (Shen *et al.*, 2012).

De plus, la LHb module l'activité des neurones 5-HTergiques du RD (pour revue, Zhao *et al.*, 2014 ; Wang et Aghajanian, 1977) et la transmission 5-HTergique (Reisine et al., 1982). La LHb reçoit également un signal de retour 5-HTergique (Wang et Aghajanian, 1977 ; Mengod *et al.*, 1990 ; Aizawa *et al.*, 2012).

Par conséquent, la LHb forme un noeud de connexion entre les neurones monoaminergiques du tronc cérébral et du cortex qui fonctionnent en parallèle avec le faisceau

médian du télencéphale. Dans la régulation physiologique des neurones DAergiques et 5-HTergiques du tronc cérébral, les cellules de la LHb exercent, avec une relativement courte latence, une forte influence inhibitrice (Wang et Aghajanian, 1977 ; Christoph *et al.*, 1986 ; Park, 1987 ; Shepard *et al.*, 2006 ; Ji et Shepard, 2007 ; Lecourtier et Kelly, 2007 ; Matsumoto et Hikosaka, 2007). Cette inhibition est réalisée par les efférences glutamatergiques de la LHb qui ciblent les neurones GABAergiques dans les noyaux monoaminergiques (Omelchenko *et al.*, 2009). En effet, différentes études suggèrent que la LHb exerce un contrôle inhibiteur sur le système DAergique de l'ATV. Les lésions des complexes habénulaires entraînent l'activation (Lisoprawski *et al.*, 1980), alors que la stimulation électrique de la LHb provoque l'inhibition (Christoph *et al.*, 1986) des neurones DAergiques du mésencéphale.

La LHb forme deux circuits séparés et interconnectés avec chaque noyau monoaminergique, permettant à la LHb de moduler sa puissance de sortie aux systèmes de monoamines différents, indépendamment ou conjointement (Bernard et Veh, 2012). La figure 8 résume les innervations de l'habenula avec les ganglions de la base et les systèmes monoaminergiques.

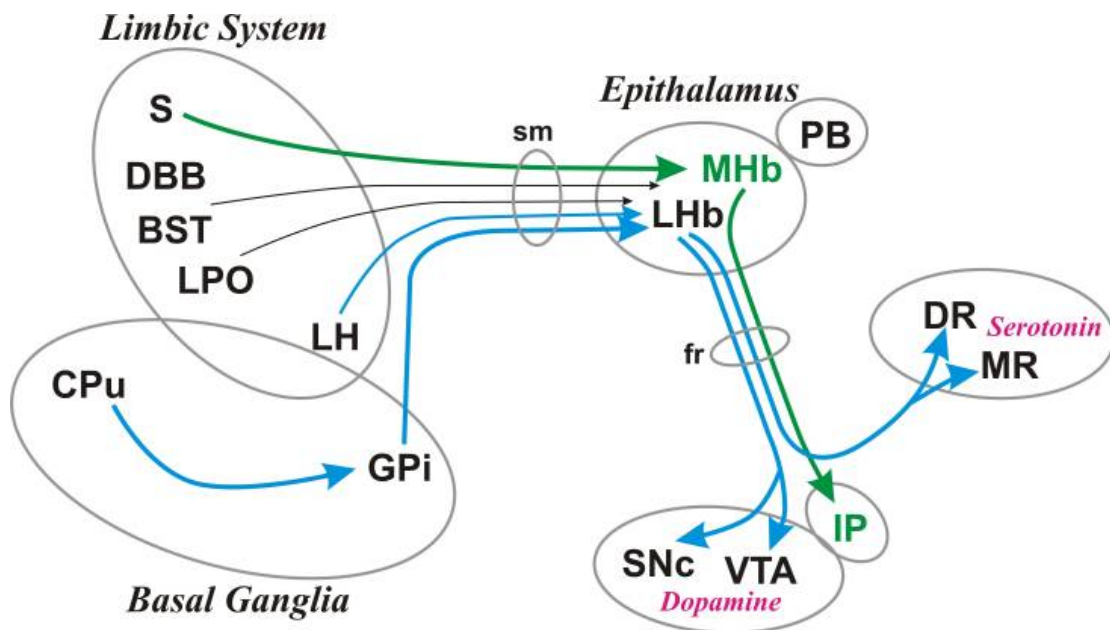


Figure 8 : Afférences et efférentes de l'habenula.

L'habenula médiane (MHb), l'habenula latérale (LHb), et la glande pinéale (PB) sont communément appelées l'épithalamus. La MHb reçoit des projections du septum supracommissural (S) et projette sur le noyau interpedonculaire (IP). La LHb reçoit des projections principalement des ganglions de la base et des régions limbiques et projette sur les structures du cerveau contenant des neurones DAergiques et des neurones 5-HTergiques. Les afférences et efférences de l'habenula sont véhiculées par la strie médullaire (sm) et le faisceau retroflexus (fr), respectivement. Les lignes vertes et bleues indiquent les connexions axonales associées à la MHb et LHb, respectivement; les lignes noires sont associées aux deux parties. L'épaisseur de la ligne indique la résistance de la liaison. Beaucoup d'autres connexions ne sont pas représentées, y compris les connexions inverses (par exemple, du RD/ATV à la LHb). SNC: substantia nigra *pars compacta*, VTA: aire tegmentale ventrale, DR: raphé dorsal, MR: raphé médian, S: septum, DBB: noyau de la bande diagonale de Broca, BST: noyau de la strie terminale, LPO: aire préoptique latérale, LH: hypothalamus latéral, GPi: segment interne du globus pallidus, CPU: le noyau caudé et le putamen, sm: strie médullaire, fr: faisceau retroflexus. Modifié à partir de Hikosaka (Hikosaka et al., 2008).

Bien que moins étudiées, La LHb reçoit également des projections NAergiques issues principalement du LC (Kobayashi *et al.*, 1974, 1975 ; Lindvall and Bjorklund, 1974 ; Gottesfeld, 1983).

V.2.3. Habenula et dépression

Sur la base de ses relations importantes avec les systèmes monoaminergiques, la LHb agit comme un noyau de relais central pour former un réseau complexe et coordonné régulant des comportements moteurs importants et le traitement de l'émotion et de l'information codée de motivation (Hikosaka, 2010 ; Klemm, 2004 ; Geisler et Trimble, 2008 ; Bianco et Wilson, 2009). Par exemple, une étude c-fos a montré que la LHb est nécessaire pour le comportement du jeu social chez les rats (Van Kerkhof *et al.*, 2013). Elle joue aussi un rôle dans les pathologies liées à l'aversion et la récompense comme les troubles de l'humeur et la toxicomanie (Hikosaka, 2010). De plus, des études expérimentales suggèrent que le dysfonctionnement de la LHb joue un rôle crucial dans la physiopathologie des principales maladies psychiatriques, comme la schizophrénie et la dépression (Ellison, 1994 ; Shumake *et al.*, 2003 ; Lecourtier *et al.*, 2004 ; Shepard *et al.*, 2006 ; Sartorius et al, 2010). En effet, la SHF de la LHb chez un patient déprimé résistant au traitement a abouti à une rémission complète (Sartorius et Henn, 2007 ; Sartorius *et al.*, 2010). D'autres études ont rapporté une hyperactivité de la LHb chez les humains déprimés (Morris *et*

al., 1999) et dans certains modèles animaux de dépression (Shumake *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2011, 2013).

De plus, des études montrant que les neurones 5-HTergiques du RD sont inhibés par la stimulation habénulaire (Wang et Aghajanian, 1977 ; Reisine *et al.*, 1982 ; Park, 1987) ont conduit à la suggestion que l'augmentation de l'activation de la LHb peut contribuer à des troubles majeurs de la dépression (*pour revue*, Shumake et Gonzalez-Lima, 2003). En outre, le métabolisme amélioré de la LHb et des niveaux de 5-HT réduits dans le cerveau ont été observés dans plusieurs modèles animaux de dépression (Caldecott-Hazard *et al.*, 1988). Ensemble, ces données suggèrent que les efférences habénulaires jouent un rôle de premier plan dans la réduction de l'activité 5-HTergique du cerveau associée à certaines formes d'humeur et de comportement dépressif.

V.2.4. Habenula et maladie de Parkinson

Des études comportementales et d'imagerie chez des rats hémi-parkinsoniens suggèrent un lien direct entre la carence en DA, la connectivité du RD et les comportements dits dépressifs. La LHb pourrait alors moduler ce lien. Ainsi la destruction des cellules de la SNc est susceptible de causer l'hyperactivité du GPi et de la LHb, qui à son tour diminue l'excitabilité et la connectivité du RD, conduisant ainsi à la dépression (Sourani *et al.*, 2012). En effet, les efférences habénulaires exercent une influence inhibitrice puissante sur les neurones DAergiques de la SNc et de l'ATV. Les lésions de la LHb augmentent le taux de DA dans les fibres terminales (Lisoprawsky *et al.*, 1980 ; Lecourtier *et al.*, 2008) tandis que la stimulation locale inhibe de façon transitoire la décharge spontanée des neurones DAergiques de la SNc et de l'ATV (Christoph *et al.*, 1986 ; Ji et Shepard, 2007). Beaucoup de patients souffrant de troubles relatifs à la DA comme la maladie de Parkinson n'utilisent pas de façon optimale le feedback négatif pour guider la sélection de l'action et la résolution de problème (Cools *et al.*, 2006), ce qui pourrait expliquer des perturbations dans le circuit de la récompense habenulo-mésencéphalique.

La figure 9 résume la connectivité entre les structures limbiques, les ganglions de la base et les systèmes monoaminergiques illustrant leur rôle majeur dans les comportements anxieux et dépressif retrouvés chez les patients parkinsoniens.

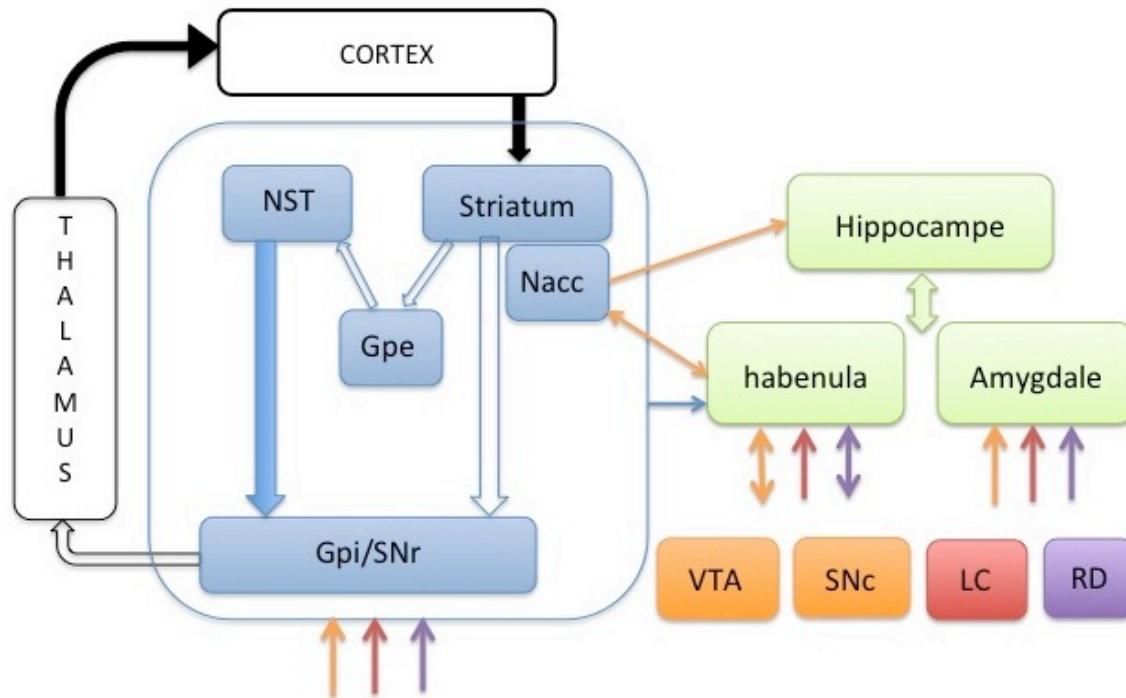


Figure 9 : Représentation schématique de l'innervation des structures limbiques avec les ganglions de la base et les systèmes monoaminergiques. En jaune : innervation dopaminergique issue et/ou vers l'aire tegmentale ventrale (VTA) et la substance noire *pars compacta* (SNc). En rouge : innervation noradrénergique issue et/ou vers le locus coeruleus (LC). En violet : innervation sérotoninergique issue et/ou vers le raphe dorsal (RD). En bleu : ganglions de la base. Flèches pleines : projections excitatrices glutamatergiques ; flèches vides : projections inhibitrices. NST : noyau sous-thalamique ; Gpe : globus pallidus externe ; Nacc : noyau accumbens ; Gpi : globus pallidus interne ; SNr : substance noire *pars reticulata*

Objectifs généraux

La maladie de Parkinson semble donc être une pathologie dont les trois systèmes monoaminergiques sont affectés et non une pathologie purement dopamino-dépendante. Cependant, l'impact de chaque déplétion monoaminergique sur les comportements moteurs et non moteurs ainsi que sur l'activité des neurones des structures des ganglions de la base ainsi que du système limbique reste à élucider. De plus, l'efficacité ainsi que les effets secondaires induits par les traitements pharmacologiques et chirurgicaux utilisés chez les patients parkinsoniens dépendent-ils de ces différentes déplétions ?

L'objectif de mon travail de thèse s'inscrit dans ce champ de recherche visant à mieux comprendre la physiopathologie de la maladie de Parkinson, ce qui permettra d'améliorer les thérapeutiques existantes et de développer de nouvelles approches. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rôle respectif des trois monoamines (DA, NA et 5-HT) dans la physiopathologie de la maladie. Pour cela, nous avons étudié les effets des déplétions monoaminergiques une à une ou combinées sur les comportements moteurs et non moteurs chez le rat. Nous avons également étudié l'impact des différentes déplétions monoaminergiques sur l'activité électrique des neurones d'une structure majeure des ganglions de la base, le NST, impliquée dans le contrôle moteur, mais également des structures limbiques impliquées dans les troubles non moteurs, l'amygdale et l'habenula. Dans un second temps, nous avons évalué l'impact de ces mêmes déplétions monoaminergiques sur l'efficacité ainsi que sur les effets secondaires des traitements existants de la maladie de Parkinson à savoir la SCP du NST et la L-Dopa.

Matériel & Méthodes

MATERIEL ET METHODES

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats adultes mâles de souche Sprague-Dawley pesant entre 280 et 400g. Les rats ont été conditionnés en cage collective (4 par cage) sous conditions de lumière artificielle (cycle 12h jour/12h nuit), à 24°C avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les Directives du Conseil de la Communauté Européenne (2010/63/UE) et avec l'autorisation du comité éthique pour l'expérimentation animale de Bordeaux (N° 50120126-A) ainsi que celle du comité éthique de l'Université de Maastricht pour les expériences réalisées au sein de leur laboratoire dans le cadre d'une collaboration entre le Dr Benazzouz et le Dr Temel.

I. Modèle d'étude

I.1. Différents groupes d'animaux utilisés et chronologie

I.1.1. Déplétions DAergique, NAergique et 5-HTergique :

Cinq groupes ont été réalisés dans la première étude: le groupe sham ne recevant que du NaCl (0.9%), le groupe 6-OHDA (6-hydroxydopamine), recevant une injection de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (MFB, medial forebrain bundle) puis des injections de NaCl (0.9%) intrapéritonéales (i.p.), le groupe 6-OHDA/DSP-4 recevant une injection de 6-OHDA dans le MFB puis une injection i.p. de DSP-4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine), le groupe 6-OHDA/pCPA recevant une injection de 6-OHDA dans le MFB puis des injections i.p. de pCPA (p-chlorophényl-alanine), et le groupe recevant les trois injections. La figure 10 schématise l'ensemble de ces groupes ainsi que la chronologie des déplétions par rapport aux tests.

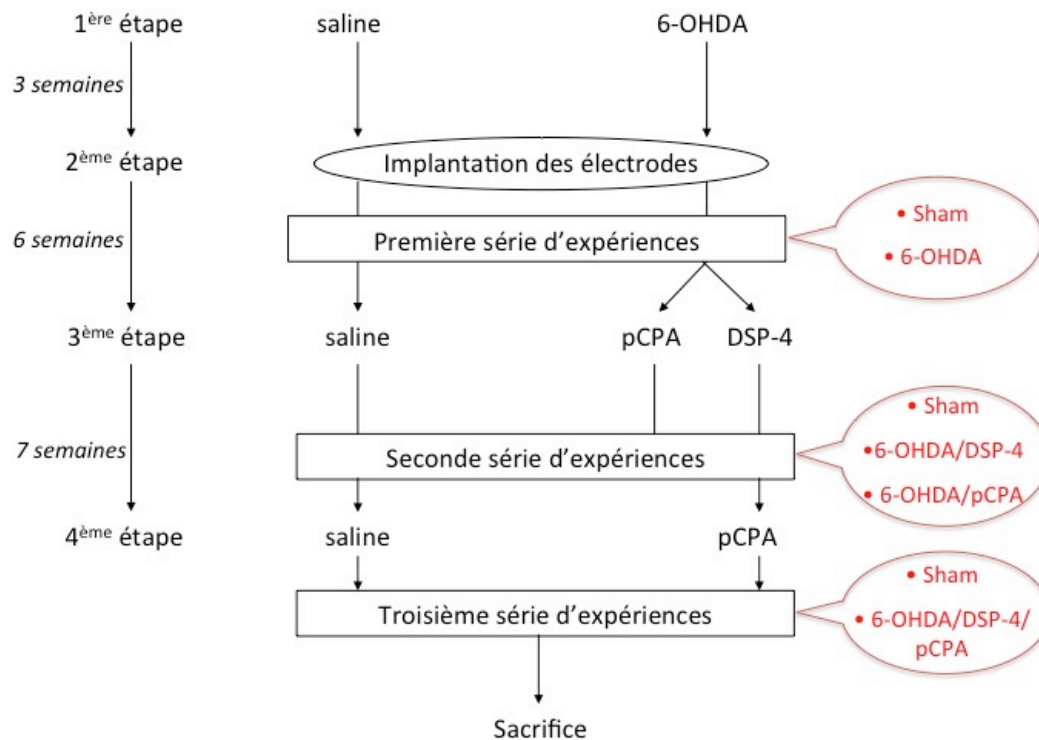


Figure 10: Récapitulatif des groupes utilisés suite aux déplétions dopaminergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques et chronologie des déplétions et des expériences. 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; DSP-4: N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine ; pCPA : p-chlorophényl-alanine; saline : injection de NaCl (0.9%).

I.1.2. Lésion du système DAergique:

Les animaux ont été rendus parkinsoniens par une injection stéréotaxique bilatérale de 6-OHDA dans le MFB selon les coordonnées stéréotaxiques de l'atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1996). Au niveau du MFB se trouvent les fibres DAergiques issues de la SNc qui projettent sur le striatum ; en y injectant la 6-OHDA, toxine spécifique des neurones catécholaminergiques, les corps cellulaires des neurones DAergiques de la SNc sont lésés de façon rétrograde.

Avant l'anesthésie par injection i.p. de kétamine hydrochloride (75mg/kg) et de xylazine hydrochloride (10mg/kg), le rat est traité à la désipramine (0,4%, 5 ml/kg) permettant l'inhibition de la recapture de la NA et donc une protection des neurones NAergiques contre la toxicité de la 6-OHDA. Le rat traité et anesthésié est ensuite placé sur un cadre stéréotaxique (Unimecanique, France). Le crâne est mis à nu puis séché afin de distinguer les repères anatomiques à la surface du crâne : bregma et lambda. A l'aide de l'atlas stéréotaxique

de Paxinos et Watson (1996), les MFB droit et gauche sont atteints en déplaçant la canule aux coordonnées suivantes : AP (antéropostérieur) : - 2,8 mm par rapport au bregma; L (latéral) : $\pm 2,0$ mm par rapport à la ligne médiane; DV (dorsoventral) : -8,4 mm par rapport à la surface des méninges. La 6-OHDA associée à de l'acide ascorbique (6,7 μg ; sigma) a été dissoute dans un volume de 4 μl de NaCl 0,9 % (1,675 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et 2 μl ont été injectés dans chaque MFB à l'aide d'une pipette Hamilton. Après suture et injection d'antibiotique (100 μl Borgal 7,5% en intra musculaire) et d'analgésique (100 μl Ketofen en sous cutané), les rats ont été gardés sous lampe chauffante jusqu'à leur réveil. Les animaux sont ensuite nourris au lait premier âge, aux pommes et aux chocapic (Neslé®) pendant 3 jours. Les animaux sont ensuite remis à l'animalerie pendant quatre semaines avant le début des expérimentations.

I.1.3. Lésion du système noradrénergique

La dénervation sélective des afférences NAergiques issues du LC a été réalisée par une injection i.p. de DSP-4 deux semaines après l'injection de 6-OHDA dans le MFB. Les fibres terminales du LC sont sélectivement dégradées par cette neurotoxine (50 mg/kg i.p., Sigma, Fritschy et Grzanna, 1989). Le DSP-4 a été dissout dans une solution saline (NaCl 0,9%) et immédiatement administré aux animaux. Ils sont ensuite remis à l'animalerie pendant une semaine avant le début des expérimentations. Le DSP-4 à 50mg/kg permet d'obtenir entre 80 et 90% de déplétion NAergique (Fritschy et Grzanna, 1989).

I.1.4. Lésion du système 5-HTergique

La déplétion en 5-HT a été réalisée par une injection i.p. de pCPA, un inhibiteur sélectif de la tryptophane hydroxylase (enzyme limitante de la synthèse 5-HT). Il s'agit d'une déplétion aigüe et réversible. La pCPA (50 mg/kg) a été dissoute dans du NaCl (0,9 %) et immédiatement administrée de façon répétée sur 2 jours consécutifs aux animaux. La pCPA étant un inhibiteur enzymatique et non une toxine, les expérimentations se sont déroulées dans les 3 jours qui suivent ces injections. Ce protocole d'injection permet d'obtenir environ 80% de déplétion 5-HTergique (Delaville et al., 2012).

I.2. Nouveau modèle de déplétions monoaminergiques par lésion des corps cellulaires

Pour la suite de l'étude, cinq groupes ont été réalisés: le groupe sham ne recevant que du NaCl (0.9%), le groupe avec la déplétion en DA, recevant une injection i.p. de désipramine suivie d'une injection de 6-OHDA puis de NaCl (0.9%) dans le MFB, le groupe avec la déplétion en DA et NA recevant une injection de 6-OHDA puis de NaCl (0.9%), dans le MFB, le groupe avec la déplétion en DA et 5-HT recevant une injection i.p. de désipramine suivie d'une injection de 6-OHDA puis de 5,7-DHT dans le MFB et le groupe recevant les deux injections de 6-OHDA et 5,7-DHT dans le MFB. La figure 11 schématise l'ensemble de ces groupes.

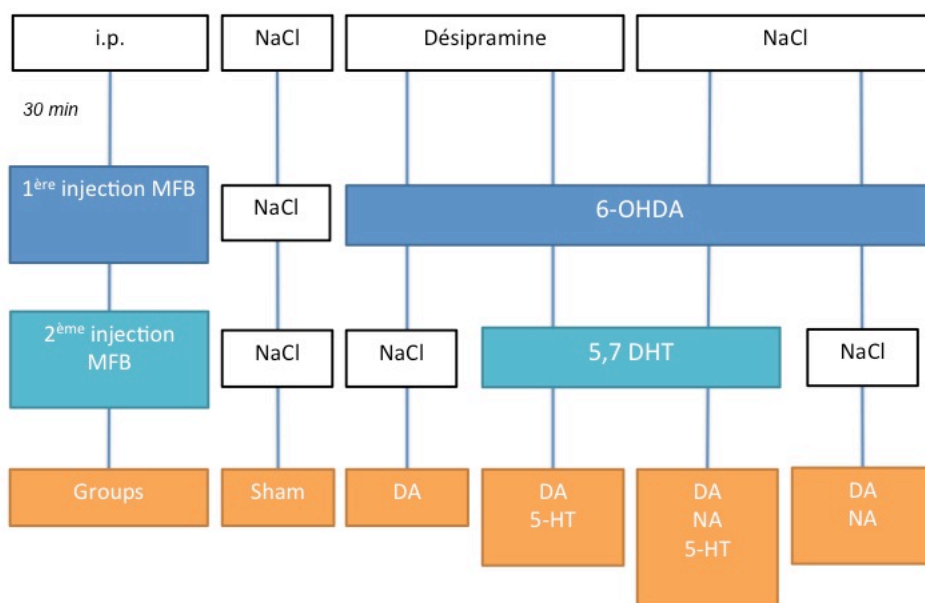


Figure11: Récapitulatif des groupes utilisés suites aux déplétions dopaminergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques et chronologie des déplétions. 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; 5,7-DHT: 5,7-Dihydroxytryptamine MFB : faisceau médian du télencéphale.

I.2.1. Lésion du système DAergique

De même que pour le premier modèle, les animaux sont rendus parkinsoniens par une injection stéréotaxique bilatérale de 6-OHDA dans le MFB, à une concentration de 1,675µg/µl, précédée par une injection i.p. de désipramine (cf I.1.2).

I.2.2. Lésion du système noradrénergique

La lésion des neurones noradrénergiques a été réalisée par injection de 6-OHDA dans le MFB à une concentration de 1,675µg/µl (cf I.1.2). Au niveau du MFB se trouvent aussi des fibres NAergiques issues du LC qui projettent sur le cortex préfrontal. En l'absence de désipramine, La 6-OHDA, toxine spécifique des neurones catécholaminergiques, va léser les corps cellulaires des neurones DAergiques de la SNc ainsi que les corps cellulaires des neurones NAergiques du LC entraînant une diminution drastique de la concentration striatale et corticale de NA (Fulceri et al., 2006).

I.2.3. Lésion du système 5-HTergique

La lésion des neurones sérotoninergiques a été réalisée par injection de 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT) dans le MFB qui contient des fibres sérotoninergiques issues du RD. Cette neurotoxine étant spécifique des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques, une injection i.p. de désipramine a été réalisée pour le groupe ne combinant que la lésion en DA et 5-HT, afin de protéger les neurones noradrénergiques. La 5,7-DHT (24 µg; sigma) a été dissoute dans un volume de 6 µl d'acide ascorbique 1% dilué dans du NaCl 0,9 % (4µg/µl) et 3 µl ont été injectés dans chaque MFB à l'aide d'une pipette Hamilton.

I.3. Application des traitements antiparkinsoniens

I.3.1. Stimulation cérébrale profonde (SCP) chez l'animal vigile

Afin de réaliser la SCP du NST, des électrodes bipolaires concentriques de stimulation (Phymep, Paris, France) ont été implantées bilatéralement au niveau médian du NST (cf. figure 12) une semaine avant les expériences comportementales. Les implantations stéréotaxiques ont été réalisées sur des rats préalablement lésés bilatéralement à la 6-OHDA. La préparation de l'animal se fait de la même façon que pour la lésion. Une fois les macroélectrodes positionnées bilatéralement aux coordonnées stéréotaxiques du NST (AP: - 3,8 mm; L: +/- 2,5 mm; P: - 8 mm), 6 vis sont fixées sur le crâne de l'animal et un casque en ciment dentaire est coulé. Ces électrodes ont ensuite été reliées au système de stimulation via un câble fixé sur un support rotatoire. Les paramètres de stimulation utilisés sont les mêmes que ceux appliqués chez les patients parkinsoniens stimulés (Limousin et al., 1998): fréquence de 130 Hz et largeur d'impulsion de 60 µs. Seule l'intensité de la stimulation est

déterminée pour chaque rat en se plaçant à une intensité inférieure à celle déclenchant des effets secondaires permanent comme des dyskinésies de la patte avant (Moyenne de 170 ± 32 μA).

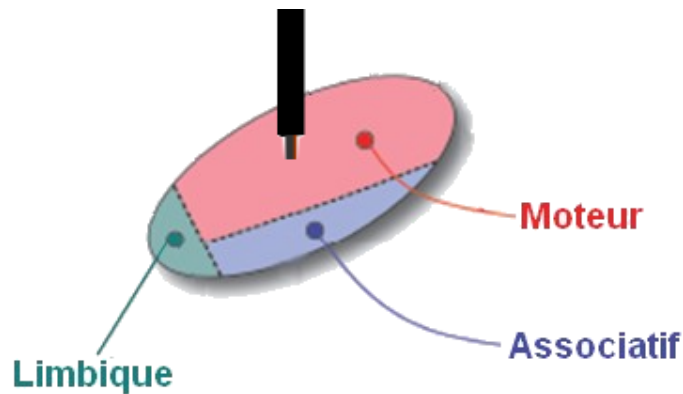


Figure 12: Schéma du site d'implantation de l'électrode de stimulation à haute fréquence. Le NST est subdivisé en trois parties chez l'homme (Benarroch, 2008) : partie motrice, limbique et associative. Chez le rat, cette subdivision n'est pas claire. Cependant, nous avons implanté l'électrode de stimulation dans la partie médiane du NST correspondant à la partie sensorimotrice.

I.3.2.Administration i.p. de Lévodopa (L-Dopa)

Le traitement pharmacologique consiste en une injection simultanée par voie systémique de L-Dopa à une dose thérapeutique de 12 mg/kg (Navailles et al., 2010) combinée à la benserazide (15 mg/kg) (inhibiteur de la dopa-décarboxylase ne traversant pas la barrière hématoencéphalique ce qui empêche la conversion de la L-Dopa en DA à la périphérie). Les tests comportementaux ont été réalisés pendant le pic d'effet de la L-Dopa, soit 40 min après l'injection (Navailles et al., 2010).

II. Etude comportementale

II.1.Mesure de l'activité locomotrice

II.1.1.Evaluation de la catalepsie: *Bar test*

Le test standard de la barre a été utilisé afin de déterminer le score de catalepsie obtenu par les animaux ayant subi une, deux ou trois déplétions monoaminergiques. Les deux pattes avant des animaux sont placées sur une barre placée à 9 cm de hauteur de la paillasse et le temps entre le placement de l'animal sur la barre et le moment où il ôte complètement une patte de

la barre est mesuré.

II.1.2.Evaluation de l'activité motrice globale: *actimétrie*

L'activité locomotrice a été mesurée à l'aide d'un actimètre (« *Open field* », Bioseb, USA). L'actimètre mesure 45x45 cm² et est équipé de deux barres contenant des faisceaux infrarouges situées à deux hauteurs différentes. Il permet de quantifier 3 types de mouvements: horizontaux, stéréotypés et redressements (Belujon et al., 2007). Chaque fois que l'animal interrompt l'un des faisceaux infrarouges de la barre la plus basse, ceci est comptabilisé comme un mouvement horizontal. Lorsqu'il interrompt le faisceau infrarouge de la barre la plus haute, ceci est comptabilisé comme redressement (ou rearing). Enfin, des mouvements plus fins, stéréotypés correspondant au grattage et au toilettage peuvent également être détectés par le faisceau du bas. Cependant, seuls les mouvements horizontaux sont représentés dans les figures des résultats car ce paramètre est le plus représentatif de l'activité locomotrice globale de l'animal. En parallèle à la mesure d'actimétrie, les animaux sont filmés par une caméra et analysés visuellement pour déterminer d'éventuels comportements anormaux, non détectés par le système. Chaque rat effectue une séance de 20 min par jour dans l'actimètre jusqu'à stabilisation du nombre de mouvements, à partir du 3^{ème} jour dans notre cas. Les animaux sont alors remis dans l'actimètre le 4^{ème} jour et la valeur de l'activité locomotrice de ce jour est considérée comme la valeur de référence de base de l'animal.

Une partie des expériences a été réalisée dans un actimètre de 1 m × 1 m (Zeef et al., 2012). Une caméra a permis le suivi du rat durant le test (Ethovision[®], Noldus Information Technology, Wageningen, the Netherlands) et ainsi d'analyser deux paramètres : la distance parcourue (cm) ainsi que la vitesse (cm/s) pendant 10min.

II.1.3.Evaluation de la coordination motrice: *Catwalk*

Le Catwalk est un système qui permet la quantification rapide et objective de multiples paramètres de la marche, statiques et dynamiques, assistée par ordinateur. Il se compose d'une passerelle de verre éclairée par une lumière fluorescente. Lorsque la patte est placée sur la vitre, la zone exacte de contact s'illumine et permet une analyse de différents paramètres de la marche via l'interface.

Avant et après chirurgie, les rats sont entraînés à traverser une passerelle (Catwalk XT8.1, Noldus, The Netherlands). Pour cela, ils sont restreints en nourriture (30 grammes de

nourriture standard par cage et par jour), puis récompensés par une pastille sucrée après un passage complet et continu d'un bout à l'autre de la passerelle. L'entraînement se poursuit jusqu'à ce que les rats remplissent tous les critères d'acquisition (Westin et al., 2011, Janssen et al., 2012). Pour une estimation correcte de la démarche, le rat doit traverser cinq fois la passerelle sans aucune interruption pour chacun des passages. Tous les paramètres de marche ont été acquis automatiquement pour chaque passage grâce à la vitre fluorescente par le logiciel du Catwalk (CW XT8.1, Noldus, The Netherlands). Les paramètres suivants ont été évalués: un paramètre statique correspondant à la distance entre les placements successifs de la même patte ainsi qu'un paramètre de vitesse: la vitesse de mouvement qui correspond à la vitesse de la patte au cours de la phase d'oscillation (phase d'absence de contact de la patte avec la vitre). Pour plus de détails, nous nous référons à Westin et al., 2011. Pour l'analyse statistique des données, 5 essais ont été moyennés.

II.1.4.Evaluation de l'activité motrice: Choice reaction time task (CRTT) dans le *Skinner box*

Les rats sont entraînés puis testés dans 10 boîtes de Skinner identiques (30.5 cm x 24.1 cm x 29.2 cm) (Med Associates, St. Albans, USA). Le plafond de ces chambres de conditionnement contient une lumière qui s'allume pendant les expériences. Une mangeoire est intégrée au centre de la paroi droite contenant un distributeur de granulés de 45 mg (AIN-76A, TestDiet, Richmond, USA). Deux leviers de 4,8 cm de largeur en acier inoxydable rétractables sont situés 2,1 cm au-dessus du sol et projetés 1,9 cm dans la chambre de conditionnement sur les deux côtés de la mangeoire. Au-dessus de chaque levier une lumière permet d'ajouter un stimulus visuel. Un stimulus sonore peut également être envisagé. Les chambres de conditionnement sont enfermées dans un boîtier insonorisant. Le bruit de fond a été réalisé par un poste de radio et un ventilateur d'extraction. Un ordinateur contrôle l'équipement expérimental et la collecte des données.

Entraînement :

Avant et après chirurgie les rats sont entraînés dans les chambres de conditionnement. Ils doivent dans un premier temps apprendre à appuyer sur un levier pour obtenir un granulé. Ils sont ensuite soumis à un renforcement continu (CRF). Les rats doivent alors appuyer cinq fois sur un levier (FR5) afin d'obtenir la récompense alimentaire de 45 mg (Klinkenberg et Blokland, 2011). Une séance se termine au bout de 60 essais ou 30 min. Les rats ont été

entraînés tous les jours (week-end compris), jusqu'à ce que les 3 dernières séances soient stables dans le temps.

The Choice reaction time task (CRTT)

Après la tâche FR5, les rats sont soumis à une tâche de temps appelée CRTT (Cao et al., 2006). Pour débiter l'essai, le rat doit maintenir son museau à l'intérieur de la mangeoire jusqu'à ce qu'une tonalité soit entendue. La durée d'attente de la tonalité est variable et est choisie au hasard, pour chaque essai, de 0,6 à 1.5 s (par pas de 0,1 s). Lors de la présentation de la tonalité, à la fois les leviers gauche et droit (situés à égale distance de la mangeoire) apparaissent. Afin d'obtenir la récompense alimentaire, le rat doit appuyer sur le bon levier. Celui-ci est associé à une tonalité forte ou faible et signalé par une lumière. Quand un rat n'attend pas la tonalité pour sortir son museau de la mangeoire, les leviers n'apparaissent pas et le même essai est lancé à nouveau. Quand un rat appui sur le mauvais levier, 5 secondes d'obscurité servent de punition. L'intervalle entre les essais est de 10 s. Chaque session dure 30 minutes, ou jusqu'à l'achèvement de 80 essais.

Les paramètres suivants ont été évalués pour le CRTT:

Temps d'exécution du mouvement (motor time): le temps de latence moyen entre le retrait du museau hors de la mangeoire et l'appui sur le levier. Les temps supérieurs à 2 s ne sont pas considérés comme de «vrai» temps moteur. Pour éviter l'inclusion des temps non valides, il a été décidé d'introduire un seuil limite, commun avec celui des humains. En général, seulement 1-2% de tous les temps moteur étaient invalides et non évalués.

Temps de réaction : le temps de latence moyen entre le retentissement du son et la sortie du museau hors de la mangeoire.

II.2.Mesure de l'anxiété et de la peur: *Elevated plus maze*

L'anxiété et les comportements de peur ont été mesurés à l'aide d'un labyrinthe en croix surelevées (*Elevated Plus Maze*, EPM). Ce test permet d'évaluer l'état anxieux de l'animal face à un environnement nouveau. Il s'agit d'un labyrinthe en forme de croix, constitué de deux bras ouverts face à face et de deux bras fermés face à face reliés par une plateforme centrale de 10x10 cm. Chaque bras mesure 50 cm de longueur et 10 cm de largeur, les parois des bras fermés ont une hauteur de 30 cm (l'intérêt est de donner aux rats une sensation de

sécurité). Ce labyrinthe est soulevé d'une hauteur de 75cm par rapport au sol. Chaque rat a été placé face à un bras ouvert sur la plateforme centrale afin de pouvoir explorer librement le labyrinthe pendant 5 minutes. Ce test a été réalisé dans une pièce faiblement éclairée. L'anxiété est mesurée selon deux paramètres : le temps passé dans le bras ouvert en fonction du temps total passé dans les bras, et le nombre de fois où l'animal a exploré l'extrémité des bras ouverts. Un rat dit « anxieux » entre et reste plus souvent dans les bras fermés.

II.3.Mesure des comportements dits “d’anhédonie, de motivation et de dépression”

II.3.1.Test de la preference au sucrose (“anhédonie”)

Ce test permet d'évaluer l'anhédonie de l'animal c'est-à-dire la perte de la sensation du plaisir, un des symptômes de dépression chez l'homme. Il consiste à comparer la consommation d'une solution de sucrose (choisie préférentiellement par un rat contrôle) par rapport à celle d'eau sur une durée déterminée. Pendant trois jours, les rats sont placés dans des cages individuelles avec libre accès à deux biberons d'eau et à la nourriture afin de les habituer à la présence de deux biberons et à la cage individuelle. Pendant les deux jours suivants (pré-test et test) les rats ont accès, pendant deux heures, à un biberon contenant une solution de sucrose à 1 % et à un autre rempli d'eau, ceci 30 min après le début du cycle nocturne. Durant les 5 jours du test, les deux biberons de chaque cage sont inversés aléatoirement dans le temps afin d'empêcher les préférences de place des animaux. Le pré-test sert à habituer l'animal au sucrose. Durant toute l'expérience, les rats n'ont pas été privés ni d'eau ni de nourriture. Afin de déterminer la consommation d'eau et de sucrose, le poids des biberons a été mesuré au début et à la fin du test. La préférence au sucrose (PS) est calculée grâce à l'équation suivante :

$$PS = \frac{\text{Consommation de sucrose (g)}}{\text{Consommation de sucrose (g)} + \text{consommation d'eau (g)}} \times 100$$

III.3.2. Test dit « de dépression »: Test de la nage forcée (FST):

Ce test se déroule sur deux jours consécutifs. Il consiste à placer l'animal dans un cylindre en plexiglass transparent (50cm de haut, 20cm de diamètre) rempli de 30cm d'eau à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. La profondeur de l'eau est délibérément choisie à 30cm (Borsini &

Meli, 1988) contrairement aux 15cm utilisés à l'origine par Porsolt et al. (1978) afin d'empêcher le rat de toucher le fond du cylindre. Les animaux sont filmés afin d'analyser visuellement les paramètres suivants : le temps de la nage, la durée de l'immobilité et de l'escalade des parois. Le premier jour, considéré comme le « pré-test » dure 15 min pour chaque rat et correspond à l'habituation de l'animal au milieu. Le jour « test », l'évaluation dure 5 min.

II.3.3. Test dit de motivation: *Progressive ratio task (PR10) du Skinner box*

Après l'apprentissage de la tâche FR5, les rats débute une nouvelle tâche progressiste (PR10) qui permet d'étudier la motivation chez les rats (Hodos, 1961, Klinkenberg et Blokland, 2011). Les rats doivent augmenter progressivement le nombre d'appui pour obtenir une récompense alimentaire. Pour le premier granulé, ils doivent appuyer dix fois, puis vingt fois, et ainsi de suite. Une séance s'achève si un rat n'appuie pas sur le levier pendant 2 min. Les rats sont entraînés tous les jours (week-end compris) jusqu'à stabilisation des performances. La mesure utilisée pour évaluer la motivation dans la tâche PR 10 est le nombre d'appuis fait au cours d'une session.

II.4. Applications expérimentales des tests comportementaux et analyses statistiques

II.4.1. Effets des déplétions monoaminergiques

Pour chacun des tests comportementaux, les données des différentes déplétions sont comparées entre elles et avec les animaux sham à l'aide d'une ANOVA une voie suivie d'un test post-hoc. Si la distribution normale est respectée, nous utilisons une ANOVA une voie suivie d'un test post-hoc Newman-Keuls. Dans le cas contraire, nous utilisons une ANOVA Kruskal-Wallis suivie d'un test post-hoc de Dunn's.

II.4.2. Effet des traitements antiparkinsoniens

Afin de déterminer l'effet de la SCP du NST ou de la lévodopa, chaque rat effectue une séance supplémentaire pour chacun des tests. En effet, le jour « contrôle » est suivi par un jour de traitement : L-Dopa (12mg/kg) ou SCP, puis un jour de récupération afin de vérifier que le traitement en question n'a plus d'effet. L'effet du traitement pour chaque groupe lésé est étudié à l'aide d'un t-test pairé de Wilcoxon.

III. Electrophysiologie in vivo chez le rat anesthésié

III.1. Enregistrement extracellulaire unitaire:

III.1.1. Chirurgie:

Les animaux sont préalablement anesthésiés à l'uréthane 20% dissout dans du NaCl 0,9 % (1,3 g/kg). Les rats sont immobilisés sur le cadre stéréotaxique, lui-même placé dans une cage de Faraday. Une incision cutanée médiosagittale est réalisée dans le scalp afin de mettre à nu la boîte crânienne, laquelle est ensuite séchée afin de distinguer les repères anatomiques bregma et lambda. A l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1996), la position théorique des structures ciblées est déterminée selon les coordonnées suivantes :

- Noyau sous-thalamique : AP : -3,8mm ; L : -2,5 mm ; P : 6,8 – 8,2 mm
- Amygdale : AP : -2,8mm ; L : -4,5 mm ; P : 8,0 – 9,2 mm
- Habenula : AP : -3,4mm ; L : -1 mm ; P : 4,2 – 5 mm

Une craniectomie est réalisée afin de placer l'électrode d'enregistrement selon les trois valeurs des coordonnées stéréotaxiques. La dure mère est ensuite dégagée avant de descendre l'électrode dans la structure souhaitée.

III.1.2. Caractéristiques des électrodes d'enregistrement:

Les microélectrodes sont préparées à partir de capillaires de verre (150F, WPI, UK) étirés à l'aide d'une étireuse horizontale (WPI, UK). L'extrémité de l'électrode d'enregistrement est cassée sous microscope afin d'obtenir une ouverture de la pointe à un diamètre interne inférieur ou égal à 1µm. L'impédance est mesurée et comprise entre 6 et 14 MΩ. Elles sont remplies d'une solution de NaCl 0,9% contenant 4% de bleu de Pontamine.

III.2. Acquisition des signaux

III.2.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones

Afin de caractériser l'activité neuronale des structures limbiques enregistrées (BLA, HbL), suite aux déplétions DAergique, NAergique et/ou 5-HTergique, des enregistrements extracellulaires unitaires des neurones ont été réalisés chez les rats anesthésiés à l'uréthane

20%. L'activité spontanée des neurones est filtrée (bande passante entre 300 Hz et 3 KHz) et amplifiée grâce au système « Neurolog » (Digitimer, USA). L'acquisition du signal est réalisée à l'aide du système « PowerLab » (AD Instruments, USA). Après vérification de la stabilité de l'activité du neurone, l'activité spontanée du neurone est enregistrée de façon continue pendant vingt minutes.

III.2.2. Modulation de l'activité des neurones des structures limbiques par la lévodopa

De la même façon, l'activité spontanée des neurones est filtrée (bande passante entre 300 Hz et 3 KHz) et amplifiée grâce au système « Neurolog » (Digitimer, USA). L'acquisition du signal est réalisée à l'aide du système « PowerLab » (AD Instruments, USA). Les 20 premières minutes sont utilisées pour s'assurer de la stabilité de l'activité du neurone. Ensuite, la lévodopa est injectée en i.p lentement afin d'éviter de créer de artefacts. L'activité neuronale est alors enregistrée durant deux heures.

III.3. Analyse de l'activité neuronale enregistrée:

Les enregistrements sont analysés en « off-line » en utilisant trois logiciels de traitement du signal. Le logiciel Chart « Spike histogram » (ADInstruments, USA) permet dans un premier temps de discriminer les potentiels d'action du bruit de fond. Le logiciel « Neuroexplorer » (AlphaOmega, Allemagne) permet de déterminer les paramètres électrophysiologiques comme la fréquence moyenne de décharge correspondant au nombre de potentiels d'action par seconde,. Ensuite, nous avons utilisé un algorithme « pattern », mis au point au Laboratoire nous permettant de déterminer le mode de décharge des neurones selon la méthode de Kaneoke et Vitek (1996). Cette méthode est basée sur le concept de distribution de densité et une définition statistique rigoureuse du mode de décharge. Ainsi, trois modes sont déterminés : régulier, irrégulier, et en bouffées (cf. figure 13).

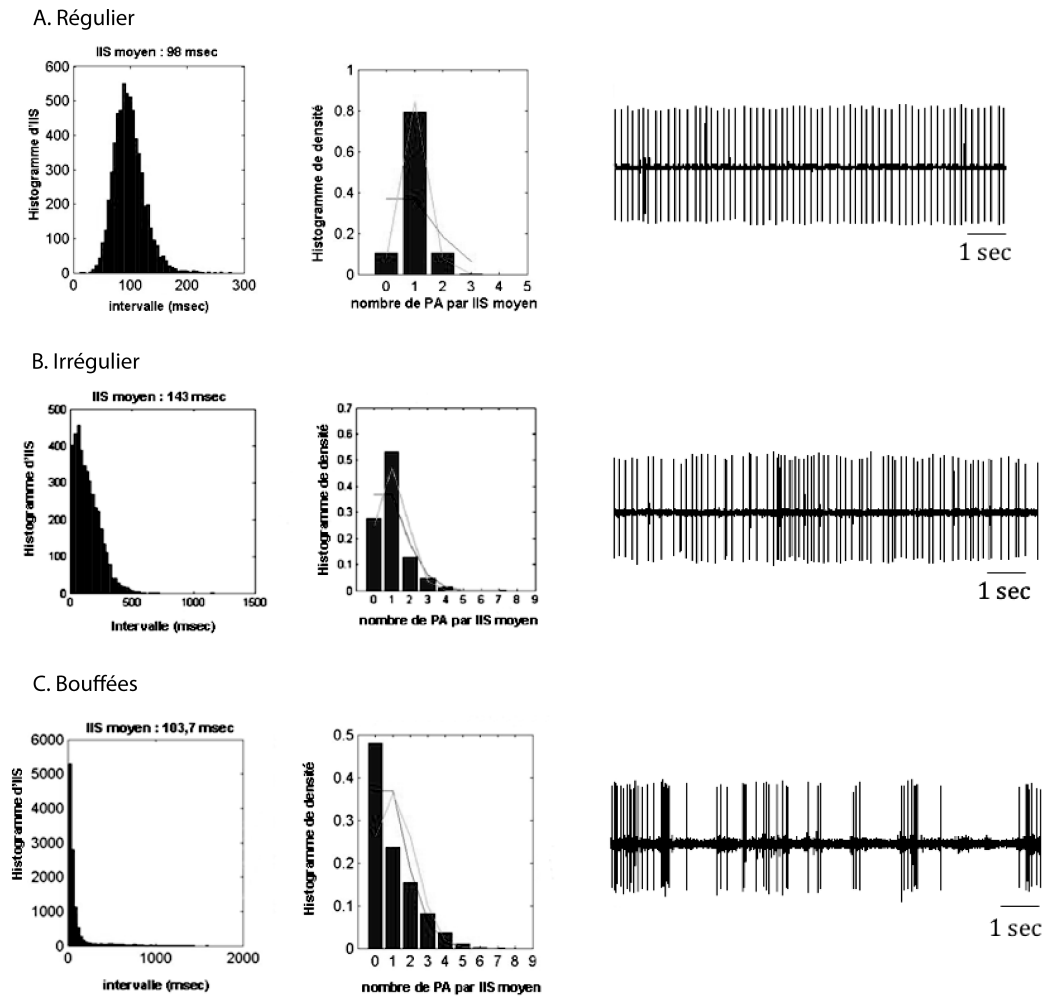


Figure 13: Les trois types de mode de décharge des neurones du noyau sous-thalamique. A. régulier, B. irrégulier, C. en bouffées. A gauche, l'histogramme de densité. Au milieu, l'histogramme d'intervalle inter-spikes (ISI). A droite, un exemple d'enregistrement brut.

A la fin de chaque séance d'enregistrement électrophysiologique, et afin de localiser le site d'enregistrement, une injection iontophorétique (DAM 80i, WPI, UK) de bleu de pontamine est réalisée *via* la pipette d'enregistrement. L'animal est sacrifié, puis le cerveau prélevé selon deux techniques différentes en fonction des besoins post mortem. Pour obtenir du tissu frais, le cerveau est récupéré immédiatement après sacrifice puis congelé dans de l'isopentane à -45°C et stocké à -80°C . Pour obtenir un tissu perfusé, le rat subit alors une perfusion intracardiaque qui permet de fixer les tissus à l'aide d'une solution formaldéhyde. Après ouverture de la cavité abdominale et pulmonaire une aiguille émoussée de gavage est placée

dans le ventricule gauche puis clampée au niveau de l'aorte. 250 mL de liquide PBS 0,01M sont ensuite envoyés dans la circulation sanguine via une pompe afin d'évacuer le sang par une incisure préalablement faite au niveau de l'oreillette droite. 300 mL de paraformaldéhyde (PAF) 4% sont ensuite injectés dans cette même circulation afin de fixer les tissus. Le cerveau est ensuite récupéré puis laissé pendant une nuit dans une solution de PAF 4%, avant d'être placé dans une solution de sucre 20% (cryoprotection) pendant 2 jours. Les cerveaux sont ensuite congelés à -45°C à l'aide d'isopentane, puis conservés à -80°C.

III.4. Analyses statistiques:

III.4.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones:

Pour l'analyse de la fréquence de décharge à la suite des différentes déplétions les analyses statistiques ont été effectuées suivant une ANOVA une voie suivie d'un test post-hoc. Si la distribution normale est respectée, nous utilisons une ANOVA une voie suivie d'un test post-hoc Newman-Keuls. Dans le cas contraire, nous utilisons une ANOVA Kruskal-Wallis suivie d'un test post-hoc de Dunn's.

Pour l'analyse de l'effet de l'injection i.p. de lévodopa sur les fréquences de décharge, un t-test païré est réalisé au sein de chaque groupe lésé.

Pour l'analyse de la répartition des populations neuronales selon leur mode de décharge régulier, irrégulier ou en bouffées, un test χ^2 a été réalisé.

IV. Histologie et immunohistochimie

IV.1. Vérification des sites d'implantations et d'enregistrements

Afin de localiser les sites d'implantations des électrodes de stimulation, la partie du cerveau contenant le NST a été coupée au cryostat et une coloration histochimique à l'acétylcholine estérase a été pratiquée. Cette coloration permet de distinguer les différentes structures sur les coupes, et le contraste qu'elle produit facilite la visualisation de la trace des électrodes de stimulation. Seuls les rats présentant une trace au niveau du NST, ont été sélectionnés pour les analyses statistiques des données comportementales.

Afin de déterminer le site d'enregistrement, le bleu de pontamine a été injecté à la fin de chaque session d'enregistrement électrophysiologique *in vivo*. Pour mieux visualiser le point de bleu de pontamine, une coloration à l'acétylcholine estérase a aussi été réalisée. La localisation du point bleu de pontamine a été réalisée grâce à l'observation au microscope optique et seuls les animaux présentant ce point bleu dans les structures visées ont été retenus pour l'analyse des données (figure 14).

Les coupes, d'une épaisseur de 25 μm (obtenues à l'aide d'un cryostat), ont été rincées avec un tampon acétate 0,2 M (27,2 g d'acétate de sodium dans un litre d'eau distillée ; pH 5,9) avant d'être incubées 4h sous agitation dans la solution d'incubation (180 ml de tampon acétate 0,2 M, 0,75 g de glycine, 0,5 g de sulfate de cuivre, 0,2 g d'iodure d'acétylcholine). Après un rinçage avec un tampon acétate 0,2 M, les coupes ont été révélées au sulfure d'ammonium (dilué au 1/100^e en tampon acétate 0,2 M), puis rincées trois fois avant d'être montées entre lame et lamelle.



Figure 14: Contrôle du site d'enregistrement électrophysiologique.

Coupes histologiques montrant le marquage au bleu de pontamine dans le NST (délimité en point noir).

IV.2. Vérification de la lésion des neurones monoaminergiques

IV.2.1. Tyrosine Hydroxylase

Un marquage de la tyrosine hydroxylase (TH) a été réalisé chez les animaux afin de vérifier l'étendue de la lésion des systèmes DAergique et NAergique des animaux lésés. Les animaux présentant une perte sévère de la coloration de la TH mesurée par densité optique dans le striatum et par comptage cellulaire dans le SNc et le LC, en comparaison des animaux sham sont considérés comme lésés en DA et en NA. Brièvement, les peroxydases endogènes sont inhibées trente minutes par de l' H_2O_2 à 3 %, puis les coupes de 50 μm sont saturées et perméabilisées trente minutes dans du PBS 0,1M-BSA 1 %-Triton X-100 0,3 %. Elles sont alors incubées toute la nuit à température ambiante avec un anticorps primaire anti-TH (fait chez la souris) dilué au 1/10000^e. Après rinçage dans le PBS, elles sont incubées deux heures avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'enzyme HRP dilué au 1/1000^e. Les coupes sont alors rincées au PBS, puis révélées avec de la DAB (Kit DAB Vector). La réaction est arrêtée par de l'eau distillée. Une fois montées, les lames sont déshydratées puis éclaircies au xylène. Une coloration au crésyl violet 0,1% est effectuée pour repérer les corps cellulaires. La figure 15 montre d'une part la perte bilatérale de l'innervation DAergique striatale (A, A') et d'autre part la diminution considérable des neurones TH immunoréactifs au niveau de la SNc (B-C') et du LC (D-F') suite à l'injection bilatérale de 6-OHDA au niveau du MFB.

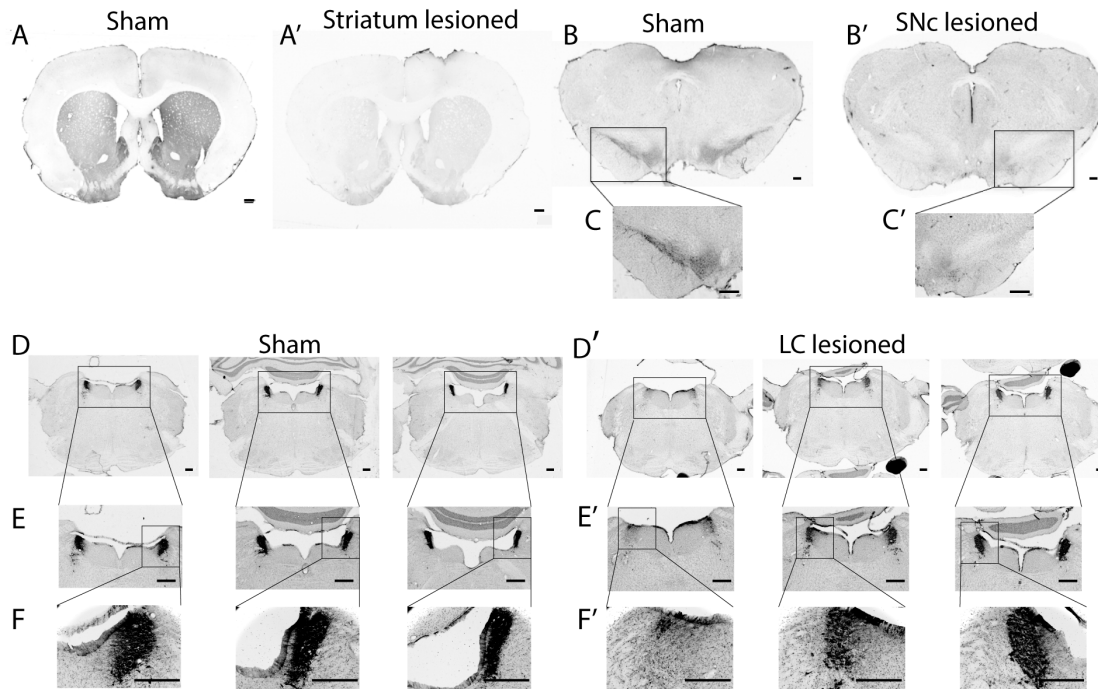


Figure 15 : Vérification de la lésion des systèmes dopaminergique et noradrénergique.

Coupe du striatum (A, A'), de la SNc (B, B', C, C') et du LC (D, D', E, E', F, F') montrant un marquage de la tyrosine hydroxylase. Les coupes A, B, C, D, E et F sont issues de rats sham non lésés et les coupes (') de rats lésés. Les coupes C, C', E, E' correspondent à un zoom $\times 2,5$ de la SNc et du LC, respectivement ; barre d'échelle : 1mm. Les coupes F et F' correspondent à un zoom $\times 10$ du LC ; barre d'échelle : 0,1 mm.

IV.2.2 Vérification de la lésion des neurones sérotoninergiques dans le RD

Un marquage de la 5-HT a été réalisé chez les animaux afin de vérifier l'étendue de la lésion du système sérotoninergique des animaux lésés. Les animaux présentant une perte sévère de la coloration anti-5-HT mesurée par comptage dans le RD, en comparaison des animaux sham sont considérés comme lésés en 5-HT. De la même manière que pour l'immuno-TH, les coupes de 20 μm sont fixées dix minutes dans du paraformaldéhyde (PAF) à 10 %, les peroxydases endogènes sont ensuite inhibées trente minutes par de l' H_2O_2 à 3 %, puis les coupes sont saturées et perméabilisées trente minutes dans du PBS 0,1M-BSA 1 %-Triton X-100 0,3 %. Elles sont alors incubées toute la nuit à $+4^\circ\text{C}$ avec un anticorps primaire anti-5-HT (fait chez la souris) dilué au $1/50^e$. Après rinçage dans le PBS, elles sont incubées deux heures avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'enzyme HRP dilué au $1/1000^e$. Les

coupes sont alors rincées au PBS, puis révélées avec de la DAB (Kit DAB Vector). La réaction est arrêtée par de l'eau distillée, les lames sont déshydratées puis éclaircies au xylène avant d'être montées entre lames et lamelles. La figure 16 montre la perte bilatérale des neurones 5-HT immunoréactifs au niveau du RD (A-C'), suite à l'injection bilatérale de 5,7-DHT au niveau du MFB.

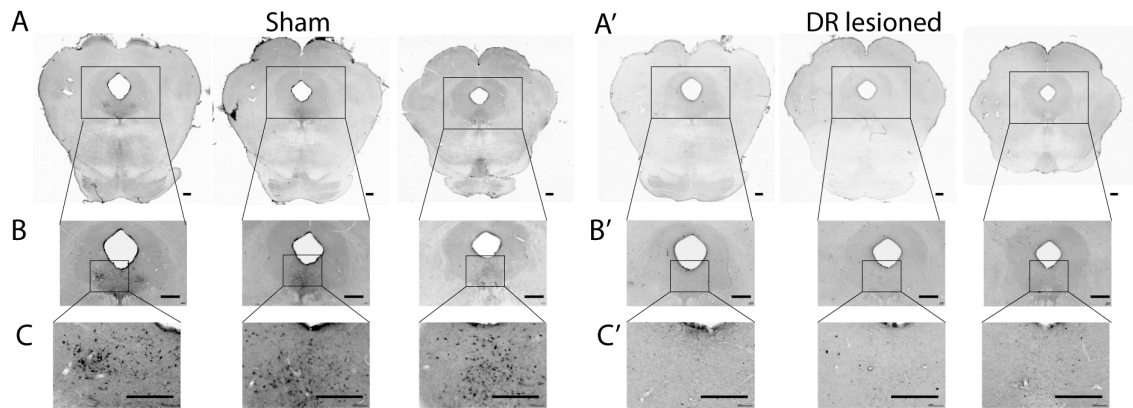


Figure 16 : Vérification de la lésion du système sérotoninergique. Coupe du RD montrant un marquage de la 5-HT. Les coupes A, B et C sont issues d'un rat sham non lésé et les coupes A', B' et C' d'un rat lésé. B et B' correspondent à un zoom $\times 2,5$ (barre d'échelle : 1mm) et C et C' correspondent à un zoom $\times 10$ (barre d'échelle : 0,1 mm) du RD.

IV.2.3 Analyse stéréologique

Le nombre de cellules immunoréactives a été obtenu en utilisant une méthode stéréologique utilisant un microscope Leica DM6000B avec un Mercator Pro software (ExploraNova, version 7.9.8). Les cellules marquées ont été comptées toutes les 6^{èmes} coupes pour la SN et le RD et toutes les 3^{èmes} coupes pour le LC après avoir adapté les paramètres stéréologiques pour la SN (taille du cadre: $80 \times 80 \mu\text{m}$, espacement: $240 \times 180 \mu\text{m}$, nombre de coupes: 5), pour le RD (taille du cadre: $60 \times 60 \mu\text{m}$, espacement: $80 \times 120 \mu\text{m}$, nombre de coupes: 4) ou pour le LC (taille du cadre: $60 \times 60 \mu\text{m}$, espacement: $80 \times 100 \mu\text{m}$, nombre de coupes: 3).

V. Détermination biochimique des contenus tissulaires en monoamines

V.1. Traitement du tissu:

Les structures cérébrales (cortex droit et gauche et striatum droit et gauche) ont été rapidement retirées de -80°C par série de 4 et de manière aléatoire et ont été directement placées dans la glace pour la pesée. Dès que le poids de la structure est déterminé, 100 ou 200 µl d'HClO₄ (0,1N, 4°C) sont ajoutés suivant le poids de la structure. Les structures sont alors dissociées pendant 5 secondes environ par sonication à 4°C et l'homogénat est centrifugé à 13000 tours/min pendant 30 min à 4°C.

V.2. Analyse par HPLC des surnageants:

La séparation des catécholamines et des indolamines a été réalisée par HPLC en phase inversée. Une pompe isocratique (modèle 116, système Gold, Beckman, Paris) délivre la phase mobile à un débit de 1,2 ml/min à travers le système (pression ~ 1500 psi).

La phase mobile utilisée dans ces conditions a la composition suivante : NaH₂PO₄ (60mM), Na₂EDTA (0,1mM), acide octylsulphonique (0,2mM), 7 % méthanol et ajustée à un pH de 3.9 avec de l'acide orthophosphorique. La colonne (Cromasyl C8, 4.6 x 150mm, 5µm, Touzard et Matignon, Paris) est précédée d'une précolonne (Browlee-Newgard, RP-8, 15 X 3.2 mm, 7µM). 20 µl de surnageant ont été injectés (après dilution adaptée dans la phase mobile) dans un injecteur manuel (vanne rhéodyne 7725) équipé d'une boucle de 200 µl (injection en boucle partielle). Le système HPLC est piloté soit par le logiciel GOLD, le logiciel ChromaNav ou le logiciel Spike 2.

V.3. Détection électrochimique:

Les catécholamines ainsi que les indolamines ont été détectées par électrochimie de type coulométrique. Ce système se compose d'une cellule de garde (modèle 5021, ESA) dont le potentiel est fixé à 0,1 V, une cellule analytique (modèle 5011, ESA) et un détecteur Coulochem I ou II (ESA). Des potentiels de + 350 mV et - 270 mV ont été appliqués pour oxyder et réduire les composés, respectivement. Le traitement du signal ampérométrique se fait par le logiciel CED. Le seuil de détection pour les différentes molécules (rapport signal/bruit=3) est d'environ 15 pg/20µl injectés.

V.4. Analyses statistiques:

Les effets des différentes neurotoxines ou drogues utilisées (la 6-OHDA, le DSP-4, la pCPA et la 5,7-DHT) sur les quantités tissulaires en DA, NA et 5-HT ont été comparés à l'aide d'une ANOVA une voie suivie d'un test post-hoc. Si la distribution normale est respectée, nous utilisons une ANOVA une voie suivie d'un test post-hoc Newman-Keuls. Dans le cas contraire, nous utilisons une ANOVA Kruskal-Wallis suivie d'un test post-hoc de Dunn's.

Article 1

Faggiani et al., 2014

(soumis)

**La déplétion combinée des monoamines altère l'efficacité
de la stimulation cérébrale profonde sous-thalamique sur
les troubles moteurs et anxieux mais pas la dépression**

Résumé :

La maladie de Parkinson est caractérisée par la manifestation de symptômes moteurs principalement associés à la dégénérescence du système dopaminergique. Malgré l'accent mis sur les déficits moteurs, la maladie de Parkinson est également caractérisée par des symptômes non moteurs, comme l'anxiété et la dépression, qui ne sont pas bien étudiés et ne sont donc pas bien traités. Alors que certaines études cliniques ont suggéré que la dégénérescence des neurones dopaminergiques pourrait aussi être à l'origine de la manifestation de l'anxiété et de la dépression, d'autres ont mis en évidence l'implication des systèmes noradrénergique et sérotoninergique dans ces troubles. Ici, nous avons étudié le rôle respectif de la dopamine, de la noradrénaline et de la sérotonine dans la manifestation des déficits parkinsoniens moteurs et non moteurs chez le rat. De plus, nous nous sommes intéressés à l'impact de la déplétion combinée de ces monoamines sur l'efficacité de la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique. Nos résultats montrent que la lésion bilatérale des neurones dopaminergiques seuls induit des déficits locomoteurs associés à l'anxiété et à un comportement « dit dépressif » modéré . Bien que l'ajout de la déplétion en noradrénaline, en sérotonine ou des deux monoamines combinées n'eut aucune incidence sur la locomotion et les troubles anxieux, la déplétion combinée des trois monoamines a considérablement aggravé le comportement « dit dépressif ». Comme attendu, la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique a amélioré de façon spectaculaire les déficits locomoteurs et le comportement anxieux chez les animaux présentant une déplétion bilatérale dopaminergique seule. Toutefois, ces améliorations ont été réduites ou annulées par la déplétion additionnelle de la noradrénaline et de la sérotonine, ce qui indique que la déplétion de ces monoamines peut interférer avec l'efficacité de la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique. En outre, nos résultats montrent que la stimulation aiguë du noyau sous-thalamique améliore le trouble "dit-dépressif" chez les animaux avec la déplétion

bilatérale en dopamine mais également chez les animaux avec la déplétion combinée des trois monoamines qui était à l'origine d'une forte immobilité dans le test de la nage forcée. Nos données mettent en évidence le rôle clé de la déplétion des monoamines dans la physiopathologie des troubles moteurs et non moteurs. Ils fournissent la première preuve que la déplétion combinée des systèmes monoaminergiques altère l'efficacité de la stimulation à haute fréquence sur les déficits moteurs ainsi que les troubles anxieux, mais pas sur le comportement "dit-dépressif".

Combined depletions of monoamines alter the efficacy of subthalamic deep brain stimulation on motor and anxiety disorders but not on depression

Running head: Monoamines, STN DBS and Parkinson

Emilie Faggiani^{1,2} (PhD student), Claire Delaville^{1,2} (PhD) and Abdelhamid Benazzouz^{1,2,*}
(PhD)

1. Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33076 Bordeaux, France.

2. CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33076 Bordeaux, France.

* To whom correspondence should be addressed: Dr. Abdelhamid Benazzouz, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

Telephone: +33 557 57 46 25; Fax: +33 556901421

E-mail: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr

Number of characters in the title: 143

Number of characters in the running head: 33

Number of words in the abstract: 239

Number of characters in the body of the manuscript (not including abstract or references, figure legends, etc.): 23369

Number of figures, color figures, and tables: 3 figures, 0 color figure and 1 table.

Acknowledgments

The “Université de Bordeaux”, the “Centre National de la Recherche Scientifique” (CNRS) and the “Association France Parkinson” funded this study.

Abstract

Despite the focus on motor deficits, Parkinson's disease is also characterized by non-motor symptoms, including anxiety and depression, which are under-studied and therefore are not well treated. Here, we first investigated the respective role of dopamine, norepinephrine and serotonin in the manifestation of parkinsonian-like motor and non-motor deficits in the rat. In a second time, we studied the impact of combined depletions of these monoamines on the efficacy of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus (STN-DBS). We showed that bilateral dopamine depletion alone induced locomotor deficits associated with anxiety and mild "depressive-like" behavior. Although additional depletions of norepinephrine and/or serotonin had no impact on locomotor and anxiety disorders, combined depletions of the three monoamines dramatically exacerbated "depressive-like" behavior. As expected, STN-DBS markedly reversed locomotor deficits and anxiety behavior in animals with bilateral dopamine depletion alone. However, these improvements were reduced or lost by the additional depletion of norepinephrine and/or serotonin, indicating that the depletion of these monoamines may interfere with the antiparkinsonian efficacy of STN-DBS. Furthermore, our results showed that acute STN-DBS improved "depressive-like" disorder in animals with bilateral depletion of dopamine and also in animals with combined depletions of the three monoamines-induced severe immobility in the forced swim test. Our data highlight the key role of monoamine depletions in the pathophysiology of motor and non-motor disorders. They provide the first evidence that combined depletions of monoamines alters the efficacy of STN-DBS on the motor and anxiety disorders.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is characterized by the manifestation of motor symptoms mainly attributed to the degeneration of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNc)¹. Furthermore, despite the focus on motor deficits, PD is also characterized by the manifestation of non-motor symptoms, including anxiety and depression, which can be present in more than 40% of PD patients². These non-motor features are under-studied and therefore are not well treated. While some clinical studies have suggested that anxiety and depression might be related to the degeneration of DA cells³, others reported the implication of norepinephrine (NE)^{4,2} and serotonin (5-HT)⁵ cell loss reaching 70% in the locus coeruleus and 40-50% in the dorsal raphe respectively. Accordingly, NE and 5-HT depletions have been suggested as other landmarks of PD. Although these studies pointed the implication of NE and 5-HT depletions, a specific role for each neurotransmitter in the pathophysiology of PD is still under debate. Because PD is a multi-system disorder, depletion of DA alone in animal models has failed to simultaneously elicit both the motor and non-motor deficits of PD. In a recent study using the unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of PD⁶, we provided evidence for the exacerbation of behavioral deficits when NE and/or 5-HT depletions were combined with DA depletion, suggesting that PD should be modeled as a monoaminergic pathology.

The restoration of dopaminergic transmission by L-Dopa has been used successfully to dramatically improve the cardinal motor symptoms for several years⁷. However, after 4-6 years of L-Dopa treatment, patients develop major motor fluctuations, loss of efficacy and various complications such as dyskinesia, which represents a major drawback. At this stage, deep brain stimulation (DBS) of the subthalamic nucleus (STN), using high frequency, has been proposed as an excellent alternative. This has been shown in MPTP-treated monkeys^{8,9},

which allowed its successful transfer to patients with advanced PD¹⁰. STN-DBS is admitted as the neurosurgical therapy of choice for improving motor performance in PD patients; however, accumulated data from the literature is confusing about behavioral abnormalities, because post-operative mood outcome is influenced not only by STN-DBS itself, but also by a reduction in medication, leading to a dopamine withdrawal syndrome¹¹.

The present study aimed to develop new animal models of PD in the rat with different bilateral monoaminergic system depletions in which we i) first, investigated the respective role of the three monoamines in the manifestation of parkinsonian-like motor and non-motor deficits and ii) second, we studied the impact of bilateral combined monoamine depletions on the efficacy of STN-DBS on motor, anxiety and “depressive-like” disorders.

Materials and methods

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats, weighing 280 g in the beginning of the experiments were used. They were housed four per cage under artificial conditions of light (12h light/dark cycle, light on at 7:00 a.m.), temperature (24°C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All animal experiments were carried out in strict accordance with the Council Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol was approved by the local Committee on the Ethics of Animal Experiments “Comité d’éthique pour l’expérimentation animale Bordeaux” (Permit Numbers: 50120126-A and 50120136-A).

Monoamines depletions

DA depletion. Bilateral DA depletion was obtained by bilateral stereotaxic injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA, Sigma, France) in the medial forebrain bundle (MFB). After ketamine/xylazine (Sigma) anesthesia (ketamine hydrochloride 75 mg/kg, i.p. and xylazine hydrochloride 10 mg/kg, i.p., rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, France). Thirty minutes before the 6-OHDA injection, animals received an i.p. injection of desipramine (25 mg/kg, Sigma) to protect NE neurons. Desipramine was dissolved in 0.9% NaCl and injected in a volume of 5 ml/kg body weight. During surgery, the body temperature was maintained at +37°C with a feedback-controlled heating pad. Each animal received a bilateral injection of 6-OHDA (3.3 µg dissolved in 2 µl sterile NaCl 0.9%) mixed with 0.1% ascorbic acid into the two MFBs over a 5 minutes period using a 10µl Hamilton microsyringe. The coordinates were 2.8 mm posterior to bregma (AP), 2 mm lateral to the midline (L) and 8.4 mm below the skull (D) according to the brain atlas of Paxinos and Watson¹². After surgery, the rats were returned to the animal facility with food and water available *ad libitum*, and in addition, they were nursed and fed with additional cereals, apple and formula milk during three days.

NE depletion. NE depletion has been performed using N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4, Sigma), a neurotoxin highly selective for NAergic fibers arising from the LC that does not affect other NAergic systems, such as the sympathetic nervous system¹³. DSP-4 was used at a dose of 50 mg/kg (i.p. injection), which was dissolved in 0.9% NaCl and administrated two weeks after 6-OHDA injection as previously reported⁶.

5-HT depletion. 4-Chloro-L-phenylalanine (pCPA, SIGMA), a selective inhibitor of tryptophane hydroxylase, was used at the dose of 50 mg/kg (i.p. injection), dissolved in 0.9% NaCl and administered during two successive days, three weeks after 6-OHDA injection as previously described⁶.

Implantation of the stimulating electrodes and electrical stimulation of the STN

Two weeks after 6-OHDA injection, rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, Unimecanique, France) under xylazine/ketamine anesthesia as described above, and the body temperature was maintained at +37°C with a feedback-controlled heating pad. Each animal received bilateral implantation of a concentric bipolar stimulating electrode (Phymep, France) in each STN at the coordinates given by the brain atlas of Paxinos and Watson: 3.8 mm posterior to bregma, 2.5 mm lateral to the midline, and 8 mm below the skull. The electrodes were fixed to the skull with stainless steel screws and dental cement. Rats were placed in the animal facilities for one week to recover before behavioral testing.

The stimulation parameters we used were similar to those used in parkinsonian patients for the frequency (130 Hz) and the pulse width (60 μ s)¹⁴. The current intensity was adapted to the rat by determining for each animal the threshold inducing the improvement of locomotor deficits without side effects and the delivered intensity was under this threshold (mean \pm SEM= 170 \pm 32 μ A). The stimulation was applied 10 min before starting the session and was maintained during all the time of behavioral tests.

Evaluation of locomotor activity in the Open-field

Spontaneous locomotor activity was measured using a photoelectric actimeter (Actitrack, Panlab, S.L., Barcelona, Spain). The apparatus consisted of a transparent cage that was connected to a photoelectric cell. Light beams detected movement, and the total number of horizontal movements of each rat was recorded over two successive sessions of 10 min each day. All testing in the actimeter was done in an isolated room between 8:00 A.M. and 1:00 P.M. The first phase involved in habituation (three days); after fixing the stimulation cable to macro electrodes, spontaneous locomotor activity was recorded. The fourth day is considered as the test day without the stimulation. The first session of 10 min was considered as the daily

habituation. Only the locomotor activity recorded during the second session of 10 min was used for data analysis. The day after, the stimulation was turned ON and the rat was placed into the actimeter, and locomotor activity was recorded during two sessions of 10 min. One day after STN-HFS, a post-challenge test was done and rats were re-exposed to the actimeter to check if the values of the actimeter returned to the basal level.

Evaluation of catalepsy in the bar test

The degree of catalepsy resulting from depletions was assessed using the bar tests as previously reported¹⁵. It consisted of positioning the rat's forepaws on a horizontal bar (0.7 cm diameter) placed at 9 cm above the ground and measuring the latency for one forepaw to be withdrawn from the bar and touch the floor (descent latency). The rats that did not maintain their position on the bar received a score of 0 s and were considered non-cataleptic.

Evaluation of “depressive-like behavior” in the forced swim test (FST)

The FST is a widely and validated test used in animal models of depression^{16,6}. Testing was carried out by using a transparent Perspex cylinder (50 x 20 cm) filled with tap water (25±1°C) to a depth of 30 cm. In a pretest session, each rat was placed in the water for 15 min. The following day and 1 week later (STN-DBS), rats were placed in the water for 5 min. Recordings of behavior were taken by a digital camera placed above the cylinder. The duration of immobility was determined offline, and a rat was judged to be immobile when he remained floating in the water without struggling and was making only those movements necessary to maintain the nose above water.

Evaluation of anxiety in the elevated plus maze (EPM)

Animals were tested in the EPM to assess the anxiety-related behavior¹⁷ as previously described⁶. The EPM consisted of two open arms (50 cm long x 10 cm wide) and two walled arms (50 cm long x 10 cm wide x 38.5 cm high) with an open roof, arranged around a central platform (10 cm x 10 cm), with the two arms of each type placed opposite to each other. A camera was mounted 1.5 m above the EPM. Animals were placed onto the central platform, facing one of the open arms. The animal was allowed to explore the maze for 5 min the first time without STN stimulation and 1 week later with STN-DBS. The time spent in the open and closed arms was measured and a rat was judged to be anxious when he spent more time in the closed arms than in the open arms compared to sham rats.

Histology and biochemical assessment of monoamine depletions

Selected animals for final analysis went through a series of validation steps that were all mandatory for final inclusion. After completion of the experiments, animals were sacrificed, and their brains were removed, frozen by rapid immersion in isopentane at -45°C and stored at -80°C .

The STN part of fresh brains were cryostat-cut into 20 μm coronal sections and acetylcholine esterase staining was used, as previously described¹⁵, to determine the location of the stimulating electrodes. Only rats presenting the active part of the electrode in the STN were considered for data analysis.

Tissular dosages of DA, NE and 5-HT were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electrochemical detection, as previously described⁶, to evaluate the extent and the selectivity of monoamine depletions. Tissue concentrations of DA were measured in the striatum and those of NE and 5-HT in the frontal cortex. Both right and left portions of these brain structures were dissected, the tissues were homogenized in 200 μl

of 0.1N HClO₄ and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Aliquots of the supernatants were diluted in the mobile phase (1/2 for the cortex and 1/4 for the striatum) and injected into the HPLC column (Chromasyl C8, 150 x 4.6 mm, 5 µm) protected by a Brownlee-Newgard precolumn (RP-8, 15 x 3.2 mm, 7 µm). The mobile phase, delivered at 1.2 ml/min flow rate, was as follows (in mM): 60 NaH₂PO₄, 0.1 disodium EDTA, and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to pH 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22 µm Millipore filter. Detection of DA, NE and 5-HT were performed with a coulometric detector (CoulochemI, ESA) coupled to a dual-electrode analytic cell (model 5011). The potential of the electrodes was set at +350 and -270 mV. Results are expressed in ng/g of tissue, and each value is the mean ± SEM. The percentage of different depletions in monoamine-depleted animals was calculated with respect to sham-lesioned animals.

Statistical analysis

Statistical analyses were done using Sigma Plot program (Systat Software, San Jose, USA). Biochemical and behavioral data in different groups of animals with monoamine depletions and sham animals were compared using a One-way Anova test. When normality test passed, we used a One-way Anova test followed by a post-hoc Newmann-Keuls test when significant. When normality test failed, we used a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test when significant. The parameters of behavioral tests with and without STN-DBS were compared for each group of animals using Wilcoxon paired t-test.

Results

Striatal and cortical monoamine tissue contents are reduced bilaterally by 6-OHDA injection into the MFB and by i.p. injection of DSP-4 and pCPA.

Bilateral injection of 6-OHDA into the MFB dramatically and selectively decreased DA tissue content in the striatum (Kruskal-Wallis test, $F=31.500$, $p<0.001$, Table 1) by 89% in the 6-OHDA rats ($n=10$, $p<0.001$), by 95% in 6-OHDA/DSP-4 rats ($n=7$, $p<0.001$), by 90% in 6-OHDA/pCPA rats ($n=13$, $p<0.001$) and by 92% in 6-OHDA/DSP-4/pCPA rats ($n=10$, $p<0.001$) compared to sham rats ($n=12$). However, as expected, 6-OHDA did not significantly change the tissue level of NE and 5-HT ($p>0.05$).

DSP-4 injection selectively decreased NE tissue content in the frontal cortex (Kruskal-Wallis, $F=26.801$, $p<0.001$, Table 1) by 90% in 6-OHDA/DSP-4 rats ($n=7$, $p<0.001$) and by 88% in 6-OHDA/DSP-4/pCPA rats ($n=10$, $p<0.001$) compared to sham rats ($n=12$). However, DSP-4 did not affect the tissue level of 5-HT in 6-OHDA/DSP-4 rats ($p>0.05$).

pCPA injection selectively decreased 5-HT tissue content in the frontal cortex (Kruskal-Wallis, $F=25.761$, $p<0.001$, Table 1) by 74% in 6-OHDA/pCPA ($n=13$, $p<0.001$) and by 74% in 6-OHDA/pCPA/DSP-4 ($n=10$, $p<0.001$) compared to sham-operated rats ($n=12$), (Table 1). However, pCPA did not change the tissue level of NE in 6-OHDA and 6-OHDA/DSP-4 rats ($p>0.05$).

<i>Treatment</i> \ <i>Monoamines</i>	DA	NE	5-HT
Sham	8775 ± 113.6	208.2 ± 26	163.3 ± 14.7
6-OHDA	$783.6 \pm 149^{***}$	183.3 ± 10.7	149.8 ± 17.5
6-OHDA/DSP-4	$436.1 \pm 75.3^{***}$	$20.8 \pm 6.0^{***}$	144.0 ± 14.4
6-OHDA/pCPA	$880 \pm 192.7^{***}$	194.7 ± 14.0	$42.6 \pm 20.2^{***}$
6-OHDA/DSP-4/pCPA	$684.5 \pm 195^{***}$	$24.6 \pm 8.5^{***}$	$41.8 \pm 13.5^{***}$

Table 1. Neurochemical analysis of the effect of 6-OHDA, DSP-4 and pCPA treatments on DA, NE and 5-HT tissue contents. Tissue contents of striatal DA and frontal cortex NE and 5-HT measured by HPLC in sham rats (n=12), 6-OHDA rats (n=10), 6-OHDA/DSP-4 rats (n=7), 6-OHDA/pCPA rats (n=13) and 6-OHDA/DSP-4/pCPA rats (n=10). Values are in ng/g of wet tissue presented as the mean \pm SEM, *** $p < 0.001$ in comparison with sham rats.

Effects of bilateral monoamine depletions on locomotor activity and their impact on the efficacy of STN-DBS.

In order to verify that locomotor deficits induced by monoamine depletions are not due to the development of a secondary catalepsy, the animals of different groups were submitted to the bar test. DA depletion alone or combined with NE and/or 5-HT depletions did not induce catalepsy, as the descent latency was of a maximum of 1 sec in all groups and not significantly different from that of sham-operated animals (One way ANOVA, $F=0.357$, $p > 0.05$, data not shown).

Bilateral DA depletion alone or combined with NE and/or 5-HT significantly affected locomotor activity (One way Anova, $F=20.91$, $p < 0.001$; Fig. 1A). Indeed, bilateral DA depletion significantly decreased the score of spontaneous movements in the open-field by 49% compared to sham-operated rats ($p < 0.001$). Interestingly, additional bilateral depletion of NE and/or 5-HT did not potentiate the motor impairment induced by DA depletion alone ($p > 0.05$). Nevertheless, note that animals with combined DA and 5-HT depletions showed a higher decrease in the score of spontaneous movements (-48% compared to sham-operated rats), although not significantly different compared to the score obtained in 6-OHDA rats ($p > 0.05$).

STN-DBS was tested in the different bilateral monoamine depleted rats groups in the open-field. As expected, STN-DBS dramatically improved the locomotor activity induced by 6-

OHDA as it significantly increased the number of spontaneous movements by 130% ($p < 0.01$, compared to the values obtained in the same 6-OHDA animals without STN-DBS, Fig 1B). This beneficial effect of STN-DBS is lost when DA depletion was combined with NE and/or 5-HT depletions. STN-DBS in these groups of animals partially, but not significantly, improved locomotor activity ($p > 0.05$, Fig. 1B).

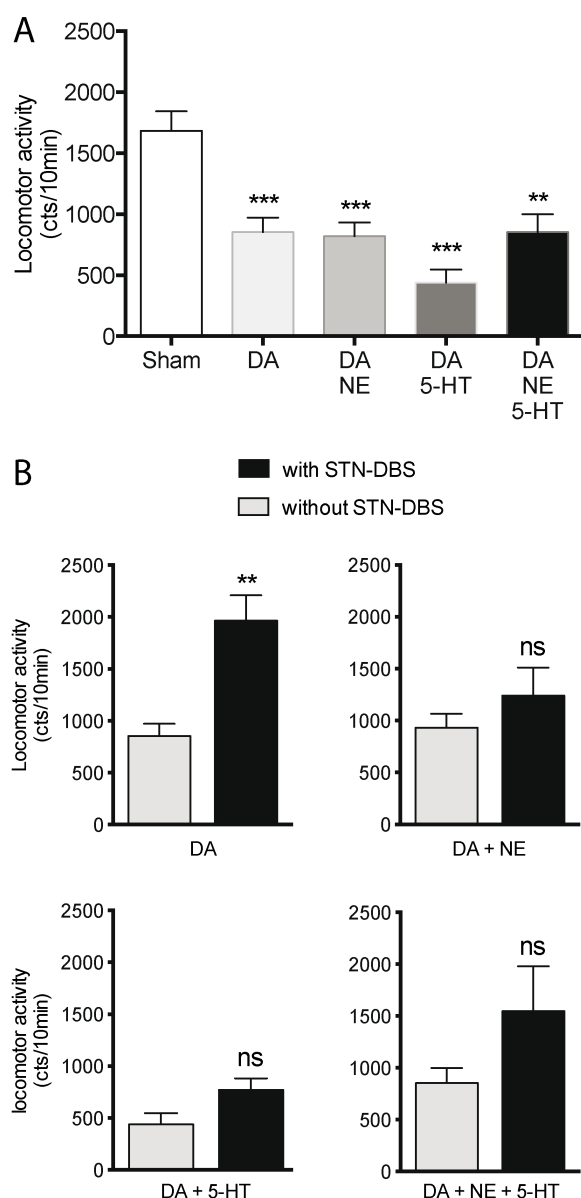


Figure 1. Effect of monoaminergic depletions on locomotor activity and their impact on the efficacy of STN-DBS. Spontaneous locomotor activity was measured in the open-field and the number of movements was automatically counted. Histogram A represents the number of spontaneous movements recorded during 10 minutes in sham rats ($n=12$), DA-depleted rats ($n=43$), 6-DA/NE-depleted rats ($n=17$), DA/5-HT-depleted rats ($n=13$) and DA/NE/5-HT-depleted rats ($n=10$). Histograms B represent the number of horizontal movements performed by the rats without and with STN-DBS in the 4 different groups. Values are the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in comparison with sham rats (A) and in comparison with monoamine-depleted animals without STN-DBS (B).

Effects of bilateral monoamine depletions on anxiety behavior and their impact on the effect of STN-DBS

Monoamine depletions induced also non-motor deficits reported in parkinsonian patients such as anxiety and depression-like behaviors. Bilateral DA depletion alone or combined with NE and/or 5-HT significantly affected the time spent in open arms of the elevated plus maze (Kruskall-Wallis, $F=25.874$, $p<0.001$, Fig. 2A). Indeed, bilateral DA depletion dramatically and significantly decreased the time spent in open-arms by 86% compared to sham rats ($p<0.001$). Interestingly, additional depletions of NE and/or 5-HT did not potentiate the decrease of time spent in the open arms as the percentage decrease was of 86% ($p<0.01$) in rats with combined depletions of DA and NE, 79% ($p<0.001$) in rats with combined depletions of DA and 5-HT and 99% ($p<0.001$) in rats with combined depletions of the three monoamines. Like for locomotor activity, STN-DBS improved the “anxiety” behavior in the group of rats with bilateral DA depletion, as it increased the time spent in the open arms by 538% ($p<0.05$, Fig 3B). However, this reversal of anxiety was lost when DA depletion was combined with NE and/or 5-HT depletions. Indeed, STN-DBS in these animal groups did not significantly change the time spent in the open arms ($p>0.05$, Fig. 2B).

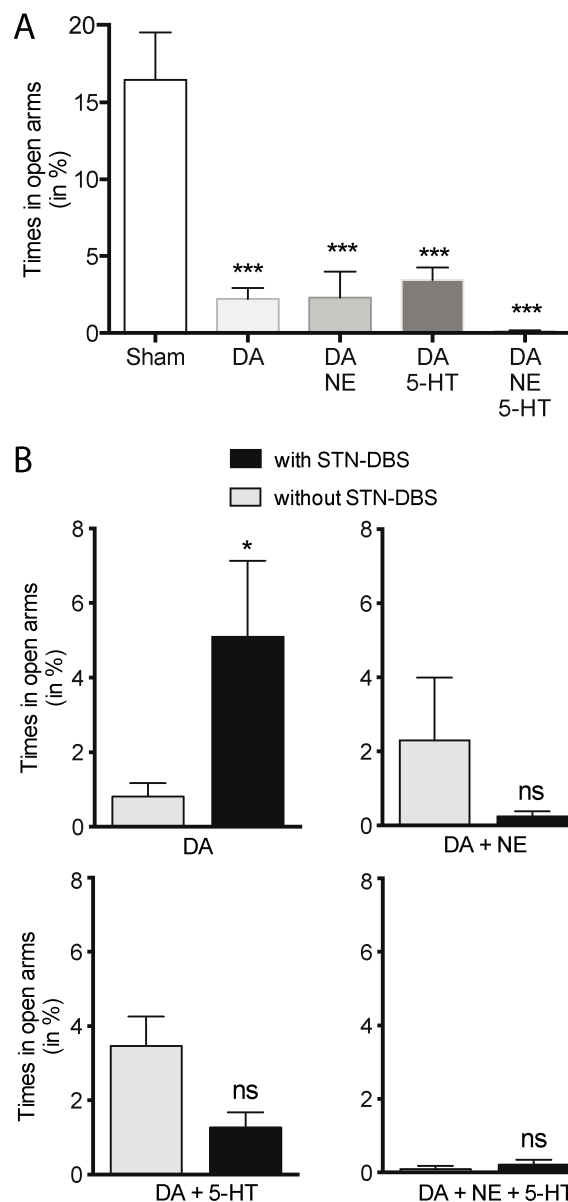


Figure 2. Effect of monoaminergic depletions on anxiety behavior and their impact on the efficacy of STN-DBS

Histogram A shows the percentage of time spent into the open arms of the EPM relative to the total time, in sham rats ($n=12$), DA-depleted rats ($n=43$), DA/NE-depleted rats ($n=17$), DA/5-HT-depleted rats ($n=13$) and DA/NE/5-HT-depleted rats ($n=10$). Histograms B represent the percentage of time spent into the open arms relative to the total time without and with STN-DBS in the 4 different groups. Values are the mean \pm SEM. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ in comparison with sham rats (A) and in comparison with monoamine-depleted animals without STN-DBS (B).

Effects of bilateral monoamine depletions on “depressive-like” behavior and their impact on the effect of STN-DBS

Bilateral DA depletion alone or combined with NE and 5-HT significantly affected the immobility time (Kruskall-Wallis, $F=31.589$, $p < 0.001$, Fig. 3A). Indeed, bilateral DA depletion alone significantly increased the immobility time by 802% compared to sham animals ($p < 0.05$). Interestingly, while DA depletion combined with NE or 5-HT depletion did not potentiate this effect ($p > 0.05$), combined depletions of the three monoamines dramatically

aggravated depressive-like behavior. Indeed, the immobility time increase in animals with triple depletion was higher (178%) than that obtained in DA-depleted animals ($p<0.001$) and was 2406% higher compared to sham animals ($p<0.001$).

STN-DBS improved the “depressive-like” behavior in animals with bilateral DA depletion, as it significantly reduced the immobility time in the forced swim test by 65% compared to the same animals without STN stimulation ($p<0.01$, Fig 3B). Similarly, STN-DBS dramatically and significantly decreased the immobility time of the more severely affected animals with combined depletions of the three monoamines (by 59%, $p<0.05$). However, STN-DBS did not induce any significant effect in animals who did not show any “depressive-like” behavior, i.e. the animals with combined depletions of DA and NE or DA and 5-HT.

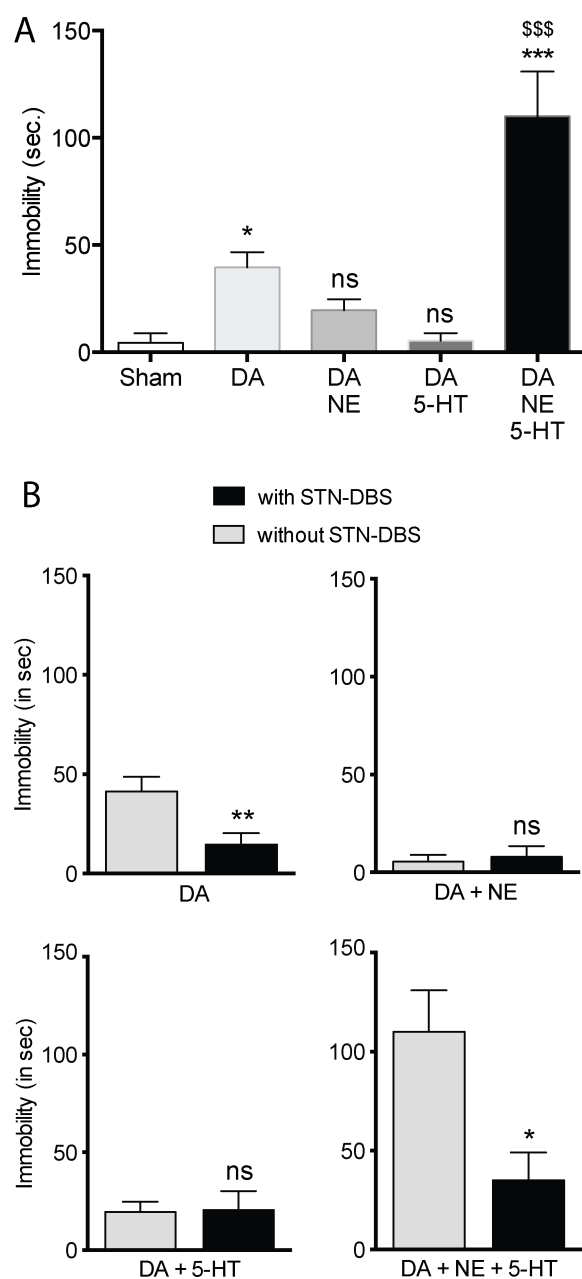


Figure 3. Effect of monoaminergic depletions on “depressive-like” behavior and their impact on the efficacy of STN-DBS

Histogram A shows the duration of immobility in the FST during the five minutes test in sham rats ($n=12$), 6-OHDA rats ($n=43$), 6-OHDA/DSP-4 rats ($n=17$), 6-OHDA/pCPA rats ($n=13$) and 6-OHDA/DSP-4/pCPA rats ($n=10$). Histograms B represent the duration of immobility without and with STN-DBS in the four different groups. Values are the mean \pm SEM. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ in comparison with sham rats and $$$$p < 0.001$ in comparison with DA-depleted rats (A) and $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ in comparison with monoamine-depleted animals without STN-DBS (B).

Discussion

The present study provides evidence that bilateral DA depletion in the rat induced motor deficits and also anxiety and mild “depressive-like” behavior. While additional depletions of NE and/or 5-HT had no impact on the motor and anxiety parameters, combined depletions of the three monoamines dramatically exacerbated “depressive-like” behavior.

Although PD has classically been considered as a pure motor disorder characterized by the degeneration of nigral DAergic cells, it is now admitted that the motor deficits are often associated with non-motor symptoms, originating from the defect of the combination of DAergic cell degeneration and the alteration of other neurotransmitter systems. Our data add evidence that NE and 5-HT systems are good candidates and that those animals with bilateral selective depletion of the three monoamines can be considered as a model of severe advanced stage of PD expressing both motor and mood disorders. The level of monoamine depletions is similar to that reported in our previous animal study⁶ and often reported in PD patients^{18,2}. A PET imaging study has shown that dysfunction in extrastriatal monoaminergic structures is delayed and occurs at a later stage of the disease¹⁹.

NE, more than 5-HT, depletion has been expected to exacerbate parkinsonian-like motor deficits, as NE depletion alone was able to reduce locomotor activity in the rat⁶ and mice²⁰. However, here we show that locomotor deficits induced by the depletion of DA were not potentiated by the additional depletion of NE and/or 5-HT in support of our previous results obtained in the unilateral DA depleted rat model⁶. These results are also consistent with those of Srinivasan and Schmidt²¹, who reported that the potentiation of akinesia was observed only when their rats were treated with a D2 receptor antagonist in addition to DA and NE depletions. The absence of differences between the different groups of depleted rats concerns

also anxiety parameters. Our results support the assumption that anxiety and PD could share some underlying biological mechanisms, such as dopaminergic transmission abnormalities. This is consistent with the findings that dopamine receptor binding and the level of dopamine uptake were reduced in the striatum of animal models and anxious patients²². Accordingly, anxiety behavior, like motor deficits, are both strongly dependent of striatal DA depletion. L-Dopa and DA agonists significantly improve anxiety in PD patients^{23,24}.

In contrast to anxiety and locomotor disorders, “depressive-like” behavior which was moderate in rats with DA depletion alone, was dramatically exacerbated by combining depletion of the three monoamines. It is unlikely that “depressive-like” behavior is a consequence of changes in motor function, as combined depletion of the three monoamines did not potentiate locomotor deficit. Furthermore, animals with combined depletions of DA and NE or DA and 5-HT did not express “depressive-like” behavior even if they developed the same level of locomotor deficit compared to animals with combined depletion of the three monoamines. Our results provide evidence that DA cell loss alone plays a role in the manifestation of mild depression and that the additional depletion of NE and 5-HT is at the origin of the severe depression reported in patients with advanced stage of PD. This can be explained by the fact that this mood disorder could result from the loss of interaction of the three monoaminergic systems. Indeed, *in vivo* microdialysis studies reported that the improvement of “depressive-like” behavior induced by antidepressants was accompanied by an increase in the level of DA, NE and 5-HT²⁵.

As expected, acute STN-DBS markedly reversed locomotor deficits and anxiety behavior in animals with bilateral DA depletion alone. However, these improvements were reduced by the additional depletion of NE and 5-HT, indicating that the depletion of these monoamines may alter the antiparkinsonian efficacy of STN-DBS. As STN-DBS has been reported to reproduce the best beneficial effect of L-Dopa^{9,14}, our results are consistent with those obtained in

animals with combined depletion of DA and NE who showed less attenuation of motor deficits in response to L-Dopa compared to DA-lesioned animals. Considering our animals as a model of severe advanced stage of PD, our results corroborate those of clinical studies showing that the motor benefit of STN-DBS partly decreases with time post-surgery, due to the natural progression of PD^{14,26,27}. Indeed, Fasano and Colleagues²⁶ reported that the motor improvement reported at 5 years (56%) was only partly retained at 8 years (39%). Based on these clinical data, our experimental results permit suggesting that during the progression of PD, NE and 5-HT cell degeneration, which accompanies DA cell loss, may interfere with the circuits involved in the therapeutic effect of STN-DBS and therefore favoring the appearance of stimulation-resistant symptoms.

Despite its motor improvement, STN-DBS has been reported to induce, in some patients, neuropsychiatric complications, such as anxiety and depression, which may adversely influence their quality of life^{28,29}. In contrast to some reported observations, our results provide evidence that acute STN-DBS improved anxiety and “depressive-like” disorders in animals with bilateral depletion of DA. Moreover, we showed that STN-DBS also improved “depressive-like” behavior in animals with combined depletions of the three monoamines. Our results are consistent with clinical studies showing that STN-DBS exerted positive effects on mood disorders^{30,31,32,33,34} and that this effect was more pronounced in PD patients diagnosed with current depression or anxiety than those that did not meet threshold criteria for diagnosis³⁰. However, our results do contrast with other clinical studies showing that STN-DBS induced adverse effects on mood²⁸. Nevertheless, STN-DBS-induced mood disorders appears to occur in only few but not all stimulated patients, and the majority of studies reported single cases^{35,28}. Interestingly, our results showed that in animals with combined depletion of DA and NE or DA and 5-HT, which did not develop “depressive-like” behavior, STN-DBS did not exert negative effects on immobility in the forced swim test. These results

demonstrate that acute STN-DBS itself is not able to induce “depressive-like” behavior suggesting that this disorder is due to disturbed brain circuitry, involving the STN, which is acutely more sensitive and responsive to DBS. Furthermore, the improvement of “depressive-like” behavior induced by STN-DBS is unlikely to be due to changes in motor function, as in animals with combined depletions of the three monoamines only a partial, not significant, improvement of locomotor deficit has been observed in our study. Differences between the different studies can be explained by the differences in patient characteristics and their individual preoperative vulnerability, surgical procedures and a reduction in medication, leading to a dopamine withdrawal syndrome with increases in anxiety and depression^{36,37,38}. As accumulated clinical data from the literature is confusing, our study supports the need for a more accurate preoperative psychiatric assessment and treatment of mood disorders as well as the need for careful postoperative follow-up²⁹. Another suggested possibility is that current spread or even direct stimulation of the ventrally located substantia nigra *pars reticulata* (SNr) through misplaced electrodes contributes to the psychiatric effects of DBS. In this respect, three case reports described acute depression caused by accidental electrode placement and stimulation in the SNr^{39,40}. This has been reproduced in animal models by the team of Temel⁴¹, who showed that DBS of the SNr was able to trigger “depressive-like” behavior linked to a decreased extracellular 5-HT in the medial prefrontal cortex. These effects may also explain the 5-HT-dependent depressive-like behavioral changes of STN-DBS reported by the same team, which are most probably due to an indirect effect through the SNr, as there is no functionally direct projection from the STN to the dorsal raphe nucleus¹⁶.

In conclusion, our data show that bilateral DA depletion in the rat induced motor deficits as well as anxiety and mild “depressive-like” behavior and that the additional depletions of NE and/or 5-HT had no impact on the motor and anxiety disorders, but combined depletions of

the three monoamines dramatically exacerbated “depressive-like” behavior. Finally, we provide the first evidence that combined depletion of monoamines alters the efficacy of STN-DBS on motor and anxiety disorders but not on "depressive-like" behavior.

Author contributions: E.F., C.D. and A.B. designed research; E.F. and C.D. performed research; E.F. analyzed data; and E.F. and A.B. wrote the paper. The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

1. Ehringer H, Hornykiewicz O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr.* 1960;38:1236-1239
2. Delaville C, Deurwaerdere PD, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 2011;5:31
3. Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet. Neurology.* 2009;8:464-474
4. German DC, Manaye KF, White CL, 3rd et al. Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Annals of neurology.* 1992;32:667-676
5. Kish SJ. Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Advances in neurology.* 2003;91:39-49
6. Delaville C, Chetrit J, Abdallah K et al. Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 2012;45:763-773
7. Cotzias GC. L-Dopa for Parkinsonism. *The New England journal of medicine.* 1968;278:630
8. Benazzouz A, Gross C, Feger J et al. Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *The European journal of neuroscience.* 1993;5:382-389
9. Benazzouz A, Boraud T, Feger J et al. Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.* 1996;11:627-632
10. Limousin P, Pollak P, Benazzouz A et al. Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.* 1995;10:672-674
11. Krack P, Hariz MI, Baunez C et al. Deep brain stimulation: from neurology to psychiatry? *Trends in neurosciences.* 2010;33:474-484
12. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotatic Coordinates.* Academic Press, San Diego. 1996
13. Fornai F, Giorgi FS, Gesi M et al. Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-4 and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse.* 2001;39:213-221
14. Krack P, Batir A, Van Blercom N et al. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England journal of medicine.* 2003;349:1925-1934
15. Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S et al. Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One.* 2009;4:e6208
16. Temel Y, Boothman LJ, Blokland A et al. Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104:17087-17092
17. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2005;29:1193-1205

18. Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Archives of neurology*. 2003;60:337-341
19. Pavese N, Rivero-Bosch M, Lewis SJ et al. Progression of monoaminergic dysfunction in Parkinson's disease: a longitudinal 18F-dopa PET study. *NeuroImage*. 2011;56:1463-1468
20. Rommelfanger KS, Wichmann T. Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*. 2010;4:139
21. Srinivasan J, Schmidt WJ. Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *The European journal of neuroscience*. 2003;17:2586-2592
22. Kano O, Ikeda K, Cridebring D et al. Neurobiology of depression and anxiety in Parkinson's disease. *Parkinson's disease*. 2011;2011:143547
23. Funkiewiez A, Ardouin C, Cools R et al. Effects of levodopa and subthalamic nucleus stimulation on cognitive and affective functioning in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2006;21:1656-1662
24. Maricle RA, Nutt JG, Valentine RJ, Carter JH. Dose-response relationship of levodopa with mood and anxiety in fluctuating Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*. 1995;45:1757-1760
25. Hajos-Korcsok E, McTavish SF, Sharp T. Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine. *European journal of pharmacology*. 2000;407:101-107
26. Fasano A, Romito LM, Daniele A et al. Motor and cognitive outcome in patients with Parkinson's disease 8 years after subthalamic implants. *Brain : a journal of neurology*. 2010;133:2664-2676
27. Castrioto A, Lozano AM, Poon YY et al. Ten-year outcome of subthalamic stimulation in Parkinson disease: a blinded evaluation. *Archives of neurology*. 2011;68:1550-1556
28. Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V. The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Progress in neurobiology*. 2005;76:393-413
29. Voon V, Krack P, Lang AE et al. A multicentre study on suicide outcomes following subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. 2008;131:2720-2728
30. Eisenstein SA, Dewispelaere WB, Campbell MC et al. Acute changes in mood induced by subthalamic deep brain stimulation in Parkinson disease are modulated by psychiatric diagnosis. *Brain stimulation*. 2014;7:701-708
31. Campbell MC, Black KJ, Weaver PM et al. Mood response to deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 2012;24:28-36
32. Czernecki V, Pillon B, Houeto JL et al. Does bilateral stimulation of the subthalamic nucleus aggravate apathy in Parkinson's disease? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2005;76:775-779
33. Funkiewiez A, Ardouin C, Caputo E et al. Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood, and behaviour in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004;75:834-839
34. Schneider F, Habel U, Volkmann J et al. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus enhances emotional processing in Parkinson disease. *Archives of general psychiatry*. 2003;60:296-302

35. Houeto JL, Mesnage V, Mallet L et al. Behavioural disorders, Parkinson's disease and subthalamic stimulation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2002;72:701-707
36. Thobois S, Remy P. [Is SPECT of interest in parkinsonian syndromes?]. *Revue neurologique*. 2008;164 Spec No 1:F17-25
37. Czernecki V, Schupbach M, Yaici S et al. Apathy following subthalamic stimulation in Parkinson disease: a dopamine responsive symptom. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2008;23:964-969
38. Krack P, Hariz MI. Parkinson disease: deep brain stimulation in Parkinson disease-what went wrong? *Nature reviews. Neurology*. 2010;6:535-536
39. Bejjani BP, Damier P, Arnulf I et al. Transient acute depression induced by high-frequency deep-brain stimulation. *The New England journal of medicine*. 1999;340:1476-1480
40. Blomstedt P, Hariz MI, Lees A et al. Acute severe depression induced by intraoperative stimulation of the substantia nigra: a case report. *Parkinsonism & related disorders*. 2008;14:253-256
41. Tan SK, Hartung H, Schievink S et al. High-frequency stimulation of the substantia nigra induces serotonin-dependent depression-like behavior in animal models. *Biological psychiatry*. 2013;73:e1-3

Article 2

Faggiani et al., 2014
En préparation

**La dégénérescence des neurones noradrénergiques et
sérotoninergiques altère les performances motrices chez le
rat modèle du stade avancé de la maladie de Parkinson**

Résumé :

La maladie de Parkinson est caractérisée par la manifestation des symptômes moteurs, comme la rigidité, les tremblements de repos, l'akinésie et la bradykinésie, principalement associés à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire. Malgré l'importance du système dopaminergique, nous avons émis l'hypothèse que la dégénérescence des neurones noradrénergiques du locus coeruleus et sérotoninergiques du raphé dorsal pourrait être également impliquée dans la symptomatologie, et particulièrement les symptômes complexes comme les troubles de la marche et de la posture. Dans ce travail expérimental, nous avons d'abord étudié le rôle respectif des lésions des structures monoaminergiques dopaminergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques dans la manifestation des différents déficits moteurs chez le rat. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les changements que ces lésions peuvent entraîner au niveau des neurones du noyau sous-thalamique. Nos résultats montrent que la lésion bilatérale sélective des neurones dopaminergiques est à l'origine des troubles de la locomotion et de la démarche qui ne sont pas potentialisés par l'ajout des lésions des neurones noradrénergiques ou sérotoninergiques. Ces résultats confirment le rôle crucial joué par la lésion dopaminergique dans la manifestation de la grande partie des troubles moteurs. Toutefois, la lésion des systèmes noradrénergiques ou sérotoninergiques joue un rôle important dans la manifestation des troubles relatifs à l'initiation et la lenteur des mouvements illustrant l'akinésie et la bradykinésie. Nous avons également mis en évidence le lien entre les troubles moteurs et l'activité neuronale du noyau sous-thalamique. En effet, la proportion des neurones déchargeant de façon irrégulière et en bouffées augmente en parallèle avec les déficits moteurs. La proportion des neurones déchargeant en bouffées augmente d'autant plus lors de l'ajout des lésions sérotoninergiques en parallèle avec l'akinésie et la bradykinésie.

Nos données mettent en évidence les rôles respectifs des trois systèmes monoaminergiques dans la manifestation des déficits moteurs de type parkinsoniens en montrant l'origine dopaminergique des troubles locomoteurs et de la démarche et fournit la première preuve que les lésions noradrénergiques et sérotoninergiques sont impliquées dans l'akinésie et la bradykinésie.

Norepinephrine and serotonin neuron degeneration alter motor performance in a rat model of advanced stage Parkinson's disease

Emilie Faggiani^{1,2}, Marcus Janssen³, Frederic Naudet^{1,2}, Yasin Temel³, and Abdelhamid Benazzouz^{1,2,*}

1. Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33076 Bordeaux, France.
2. CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33076 Bordeaux, France.
3. Department of Neuroscience and Neurosurgery, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands.

* To whom correspondence should be addressed: Abdelhamid Benazzouz, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université de Bordeaux, Campus de Carreire, Bât 3B 1er étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex
Phone : +33 05 57 57 46 25. E-mail : abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux.fr

Abstract

Despite the focus on dopaminergic neurons degeneration associated with the cardinal motor symptoms (akinesia, rigidity and tremor), Parkinson's disease is also characterized by the degeneration of norepinephrinergic and serotonergic cells, which may be involved in other complex motor symptoms, such as gait and postural disturbances. Here, we investigated the respective role of bilateral dopamine, norepinephrine and serotonin neuron degeneration in the manifestation of parkinsonian-like motor deficits and in the changes of subthalamic nucleus neuronal activity. Our results showed that bilateral dopamine depletion alone induced global locomotor deficits and gait disturbances paralleled by an increase in the proportion of bursty and irregular STN neurons. The additional lesions of norepinephrine and/or serotonin had no impact on these two symptoms. However, additional 5-HT depletion induced akinesia and bradykinesia in rats with bilateral DA neuron lesion associated with an additional increase in the proportion of bursty STN neurons.

The present study provides new insights into the respective role of monoaminergic neuron degeneration in the manifestation of parkinsonian-like motor symptoms associated with changes in the subthalamic neuronal burst activity. Furthermore, we show that NE and 5-HT cell lesions are involved in akinesia and bradykinesia.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder characterized by the degeneration of dopamine (DA) neurons in the *pars compacta* of substantia nigra (SNc) (Ehringer & Hornykiewicz, 1960). DA neuron degeneration has been associated to the key PD motor symptoms such as akinesia, rigidity, and tremor. However, despite the DA loss, PD is also characterized by the degeneration of 70% of norepinephrine (NE) cells in the locus coeruleus (German *et al.*, 1992; Delaville *et al.*, 2011) and by the loss of 40-50% of serotonin (5-HT) cells in the dorsal raphe (Kish, 2003), which may also contribute to the motor symptomatology (Devos *et al.*, 2010). This is consistent with Braak's theory, for which the neuronal degeneration in PD begins in the lower brainstem and progress caudo-rostrally with NE and 5-HT systems degenerating before the DAergic system (Braak & Del Tredici, 2008; Braak *et al.*, 2003; Del Tredici *et al.*, 2002). However, the respective role of DA, NE and 5-HT neuron degeneration in the manifestation of motor symptoms has to be clarified.

Within the basal ganglia, the subthalamic nucleus (STN) plays an key role in the pathophysiology of PD. The motor symptoms have been shown to be alleviated by either STN ablation (Bergman *et al.*, 1990; Guridi & Obeso, 2001) or high frequency stimulation (Benabid *et al.*, 2000); (Benazzouz *et al.*, 1993). After DA depletion, STN neurons, which normally exhibit a tonic discharge pattern, become bursty in animal models of PD (Bergman *et al.*, 1994; Ni *et al.*, 2001; Delaville *et al.*, 2012). This pathological bursty pattern has also been reported in PD patients (Benazzouz *et al.*, 2002). Moreover, STN is one of the structures most heavily innervated by NEergic (Boyajian *et al.*, 1987; Canteras *et al.*, 1990) and 5-HTergic (Steinbusch, 1981) terminals. Functionally, NEergic as well as 5-HTergic agents, can modulate STN neuronal activity with an impact on motor behavior in the rat (Belujon *et al.*, 2007; Delaville *et al.*, 2012b; De Deurwaerdere & Chesselet, 2000).

The most representative motor symptoms in PD is tremor and rigidity (Delwaide *et al.*, 1986). Akinesia or bradykinesia as well as gait disturbances also appear and perturb the daily living activities. These axial symptoms are characterized by hesitation of gait initiation and a reduction of kinematic gait parameters such as stride length, gait speed and swing phase duration in moderate-mild stage of PD (Morris *et al.*, 1994; Blin *et al.*, 1990; Devos *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2010). Indeed, although tests of simple motor behavior, like the Open field test, permits to characterize easily the global spontaneous locomotor activity (Francardo *et al.*, 2011; Heuer *et al.*, 2012), more complex functions that can allow more precise dissection of the motor impairment can be studied. The Catwalk test allows to study gait disturbances whereas the choice reaction time task in the Skinner box permits to investigate the slowness of movements, which is representative of akinesia or bradykinesia in animal models of PD (Dowd & Dunnett, 2004; Dowd & Dunnett, 2005). However, the impact of additional NE and 5-HT depletions in bilateral DA-lesioned rats on the precise nature of the motor impairment is not clearly established.

The present study aimed to develop new animal models of PD in the rat with different bilateral monoaminergic system lesions in which, we first investigated the respective role of the three monoamine neuron lesions in the manifestation of parkinsonian-like motor deficits, such as the global locomotor activity, gait disturbances, akinesia and bradykinésia. Then, we studied the role played by the STN in the observed effects.

Material and Methods

Animals

Adult male Sprague Dawley rats (Charles River) of ten weeks old weighing ~380 g at the time of surgery were housed at the Central Animal Facility. Animals were matched by body

weight and housed in pairs in a standard IVC cage on sawdust bedding in an air-conditioned room (~20 °C; ~60 % humidity) under a 12-h reversed light/dark cycle (lights on from 19:00–07:00 h). Food, standard laboratory chow and acidified water were available ad libitum. During the skinner box tasks the rats were food deprived and received only 15 g standard laboratory chow. The Animal Experiments and Ethics Committee of Maastricht University approved all experimental procedures.

Drugs

6-hydroxydopamine (6-OHDA), ascorbic acid, desipramine, 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT), L-Dopa methylester-hydrochloride, benserazide-hydrochloride, and all anesthesia drugs were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Surgical procedure

Rats were divided in the following five experimental groups: sham-operated rats (n=12), DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5HT-lesioned rats (n=12), and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9). In brief, one hour before surgery rats were injected with Temgesic (0.1 mg/kg, s.c.) for analgesia and rats from the group without NE cell lesion were injected with desipramine (25 mg/kg, i.p.) to protect NE neurons from 6-OHDA toxicity. Throughout surgery, rats were anaesthetized by ketamine/xylazine (ketamine hydrochloride 75 mg/kg, i.p. and xylazine hydrochloride, 10 mg/kg, i.p.). Once anaesthesia was induced, the rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, France); the skull was exposed, and burr holes were made. The vehicle or toxins were slowly injected bilaterally in the median forebrain bundle (MFB) at the following coordinates relative to Bregma (in mm: AP: 2,8 ML: +/- 2, DV -8,4), (Paxinos & Watson, 1996). Vehicle was injected in each MFB in group sham (0.2% ascorbic acid dissolved in 0.9% saline), or 6-OHDA (2 µl in each MFB

or 1.675 µg/µl; Sigma) in DA lesioned-groups and in addition 5,7-DHT (3 µl in each MFB or 4 µg/µl; Sigma) in groups with the 5-HT cell lesion. At the end of each injection, the cannula remained at the injection position for an additional 2 min and was then slowly withdrawn from the brain. After surgery, the rats were returned to the animal facility with food and water available *ad libitum*, and in addition, they were nursed *and* fed with additional cereals, apple and formula milk during three days. The rats were given a 3-weeks recovery period before behavioral assessment was started.

Open field test

To measure spontaneous locomotion, the rats were evaluated in an open field (OF) task. The OF was a black square arena (1 m × 1 m) enclosed by a 40-cm high plastic transparent wall (Zeef *et al.*, 2012). After each session, the OF was cleaned with ethanol (70%), to prevent transmission of olfactory cues. Behavioral testing started by placing the rat in the middle of the OF and was stopped after 10 min. Locomotor activity was recorded using a camera and Ethovision tracking software (Ethovision[®], Noldus Information Technology, Wageningen, the Netherlands). Distance moved (cm) and velocity (cm/s) were determined during 10 min in the arena.

CatWalk gait analysis

Before and after surgery, the rats were trained to cross the walkway (Catwalk XT8.1, Noldus, The Netherlands). They were motivated by food deprivation and rewarded with a food pellet after a complete and continuous crossing. Training continued until crossing the walkway met the criteria for acquisition (Janssen *et al.*, 2012); (Westin *et al.*, 2012). To motivate the animals on testing days, rats were food restricted (30 g standard laboratory chow per cage per day). Data were acquired before and after surgery. For a reliable assessment of gait, the rat

had to cross the walkway completely without interruption, and five crossings per animal were obtained. All gait parameters were automatically acquired for each run by the Catwalk software (CW XT8.1, Noldus, The Netherlands). The following gait parameters were evaluated: a static paw parameter: the stride length which corresponds to the distance between successive placements of the same paw and a speed and coordination parameter: the swing speed which correspond to the speed of the paw during the swing phase (phase of no contact of a paw with the glass plate). For more details we refer to (Westin *et al.*, 2012). For statistical analysis the data of 5 trials were averaged.

Skinner box

Apparatus

Rats were trained and tested in 10 identical Skinner boxes (30,5 cm30.5 cm x 24.1 cm x 29.2) (Med Associates, St. Albans, USA). The ceiling of these conditioning chambers contained a light that illuminated the conditioning chamber during experiments. The left and right sidewalls served as control panels. A recess built into the center of the right side panel contained a food tray into which a pellet dispenser delivered 45-mg food pellets (AIN-76A, TestDiet, Richmond, USA). Two 4.8 cm wide retractable stainless steel levers are situated 2.1 cm above the floor and projected 1.9 cm onto the conditioning chamber on both sides of the food tray. Above each lever a light was situated to give a visual stimulus. An audio stimulus could be given. The conditioning chambers were enclosed in sound-attenuating housing. Background noise was produced by a radio and an exhaust fan. A personal computer controlled the experimental equipment and collected the data.

Choice reaction time task

Training of animals: Before and after surgery rats first underwent magazine training sessions and were then subjected to continuous reinforcement (CRF). Next the rats were trained on a fixed ratio schedule of reinforcement, in which they had to press a lever for five times (FR5) in order to obtain a 45-mg food reward (Klinkenberg & Blokland, 2011). Reinforcement was continuous; each set of five lever presses was rewarded. A session was terminated after 60 trials or 30 min. Rats were trained everyday (including weekends) and data was collected when the last 3 sessions were stable over time. The baseline measures used to evaluate performance on the FR5 schedule were averaged for each animal over the last three sessions.

After training: rats were subjected to a choice reaction time task (Cao *et al.*, 2006). A trial started with holding the rat nose in the food tray. The rat had to hold the nose inside the tray until a tone was presented. A variable period between pushing the hinged panel and onset of the tone (hold duration) was randomly chosen in each trial from 0.6 to 1.5 s (in steps of 0.1 s). On the presentation of the tone, both a left and a right lever (located equidistantly on the left and right side of the hinged panel) were inserted into the Skinner chamber. In order to get a food reward, the rat had to press the cued lever. The cue was given by a high or low tone and the correct lever was signaled with a light. When a rat did not hold the hinged panel for the entire hold duration, the levers did not appear and the same trial was started again. When a rat pressed the wrong lever, a time-out period of 5 s was given for punishment, during which the light within the conditioning chamber was switched off. The interval between the trials was 10 s. Each session lasted 30 min or until the completion of 80 trials.

The following parameters were evaluated in the skinner box tasks:

Reaction time: the mean latency (in sec) between the tone and the release of the panel.

Motor time: the mean latency (in sec) between the release of the panel and the lever press.

Extracellular single-unit recordings

Extracellular single-units recordings in the STN were performed on the five groups of rats. Extracellular single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg i.p.) as previously reported (Ni *et al.*, 2001). A single glass micropipette electrode (impedance: 8–12 M Ω ; aperture 0.5 μ m) was filled with 4% Pontamine Sky Blue in 3 M NaCl and then lowered into the STN according to the following stereotaxic coordinates (in mm: AP: –3.8, L: –2.5, D: 6.8–8.2), (Paxinos & Watson, 1996). STN neurons were recorded in each rat and were identified according to their firing activity as previously reported (Chen *et al.*, 2011). Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass filtered (300–3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK), and transferred via a Powerlab interface (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio >3:1 was recorded and used for further investigation. Basal firing of neurons was recorded for 20 min to ascertain the stability of the discharge activity. At the end of each session, the recording site was marked by an electrophoretic injection (Iso DAM 80, WPI, Hertfordshire, UK) of Pontamine Sky Blue after recording the last neuron of the last trajectory through the micropipette at a negative current of 20 μ A for 7 min. The location of the Pontamine Sky Blue dots was histologically verified as previously reported (Belujon *et al.*, 2007), and only brains with clear blue dots in the STN were used for data analysis. A reconstruction of each recording site for each trajectory under microscope was carried out to consider only neurons recorded in the target structure.

Data analysis

The activity of each neuron was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instruments), and firing parameters (interspike interval: 5-ms bin) were calculated using Neuroexplorer program (Alpha Omega, Nazareth, Israel). Firing rates were expressed as the averaged frequency of discharge calculated over the 20-min period of stabilization, and the value for each group is the mean \pm SEM (Burbaud *et al.*, 1995). Firing patterns were analyzed as previously described (Labarre *et al.*, 2008). Three patterns were determined: a regular pattern, with a discharge density distribution of spike train that follows a near-normal distribution; an irregular pattern, which follows a Poisson distribution; and a bursty pattern, with a discharge density histogram that follows two different distributions (Kaneoke & Vitek, 1996). The number of cells discharging in each pattern was expressed as a percentage of the total number of neurons recorded.

Histology and biochemical assessment of monoamine depletions

Selected animals for final analysis went through a series of validation steps that were all mandatory for final inclusion. After completion of the experiments, animals were sacrificed, and their brains were removed, frozen by rapid immersion in isopentane at -45°C and stored at -80°C .

The STN part of fresh brains were cryostat-cut into 20 μm coronal sections and acetylcholine esterase staining was used, as previously described (Chetrit *et al.*, 2009), to determine the location of the Pontamine sky blue dots marking the recording site in the recorded structure.

Only brains in which the recording was shown to be in the STN were used for data analysis.

Tissular dosages of DA, NE and 5-HT were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electrochemical detection, as previously described (Navailles *et al.*, 2010); (Delaville *et al.*, 2012), to evaluate the extent and the selectivity of

the these monoamine depletions. Tissue concentrations of DA were measured in the striatum and those of NE and 5-HT in the frontal cortex. Both right and left portions of these brain structures were dissected, the tissues were homogenized in 200 μ l of 0.1N HClO₄ and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Aliquots of the supernatants were diluted in the mobile phase (1/2 for the cortex and 1/4 for the striatum) and injected into the HPLC column (Chromasyl C8, 150 x 4.6 mm, 5 μ m) protected by a Brownlee-Newgard precolumn (RP-8, 15 x 3.2 mm, 7 μ m). The mobile phase, delivered at 1.2 ml/min flow rate, was as follows (in mM): 60 NaH₂PO₄, 0.1 disodium EDTA, and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to pH 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22 μ m Millipore filter. Detection of DA, NE and 5-HT were performed with a coulometric detector (CoulchemI, ESA) coupled to a dual-electrode analytic cell (model 5011). The potential of the electrodes was set at +350 and -270 mV. Results are expressed in ng/g of tissue, and each value is the mean \pm SEM. The percentage of different depletions in monoamine-depleted animals was calculated with respect to sham-lesioned animals.

Data analysis

Results are expressed in ng/g of tissue, and each value is the mean \pm SEM. The percentage of different depletions in drug-treated animals was calculated with respect to sham-lesioned animals. Each rat was included according to the following inclusion criterion : >60% decrease in DA, NA and 5-HT concentrations.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Sigmaplot (Systat Software, San Jose, USA). For behavioral, histochemical and biochemical data, values were compared using a one-way Anova test followed, when significant, by a student Newman-Keuls multiple post-tests. For electrophysiological data, firing rates between all the groups were compared using a one-way

Anova test. Firing patterns were analyzed using the method developed by Kaneoke and Vitek (1996) as previously described (Boraud *et al.*, 1998) and (Tai *et al.*, 2003) to determine if STN neurons discharged with regular, irregular or bursty pattern and the proportions of neurons according to their pattern were compared using a χ^2 test.

Results

Survival and body weights

In total, 11 rats died during the first week post-surgery; the final number of animals included in the study for data analyses were: sham rats n=12; bilateral DA-lesioned rats n=8; bilateral DA/NE-lesioned rats n= 8; bilateral DA/5-HT-lesioned rats n=12 and bilateral DA/NE/5-HT-lesioned rats n=9.

After surgery, all animals were fed inside the cages, because of problems with eating from the food rack. Weight loss during the first week post-lesion was about 15,5% for the lesioned animals, while the sham group weighed 4% of their body weight in the first week after surgery. After 4 weeks, the sham animals weighed about 12% more than their pre-operative weights, while the lesioned animals weighed 10% more than their weights after 1 week. During this period of time, the animals received food ad libitum, and were not tested behaviorally. After these 4 weeks, the animals were food restricted again before behavioral testing. During the course of the present experiment, the lesioned animals did not have different weight than the sham animals (time: 45 days, One-way ANOVA, $F=4.830$, $p=0.058$) (Fig. 1).

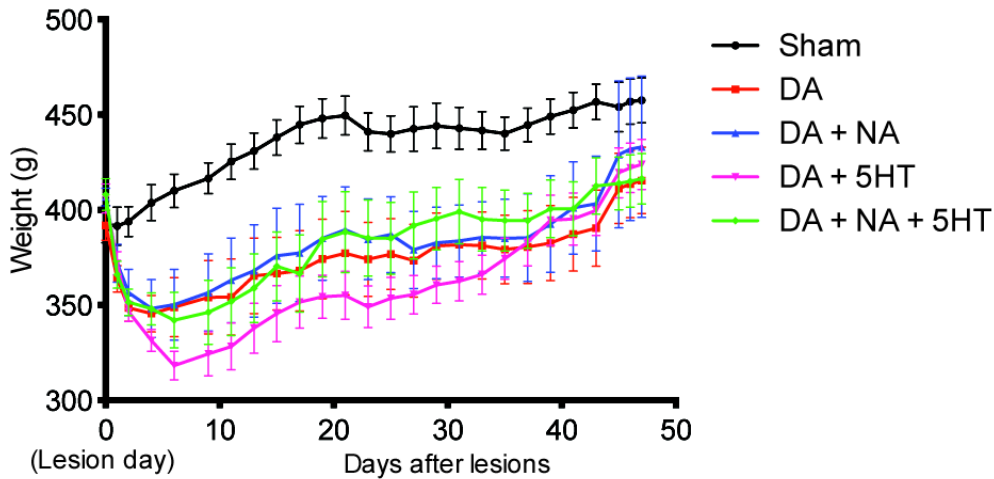


Figure 1 : Body weight : lesioned rats and sham rats have the same weight. The curves represent the weight evolution (in g) after monoaminergic lesions in sham rats (n=12), DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5-HT-lesioned rats (n=12) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9). Values are weight in g presented as the mean \pm SEM.

Effects of drug injections on the monoamine depletions

Bilateral injection of 6-OHDA into the MFB dramatically and selectively decreased DA tissue content in the striatum (One-way ANOVA, $F = 14.748$, $p < 0.001$), by 97% in the DA-depleted rats ($p < 0.001$), by 97.7% in DA/NE-depleted rats ($p < 0.001$), by 98.5% in DA/5-HT-depleted rats ($p < 0.001$) and by 97.3% in DA/NE/5-HT-depleted rats compared to sham rats ($p < 0.001$) (Table 1). However, this lesion procedure did not affect the tissue level of NE when desipramine was injected prior to 6-OHDA, and of 5-HT in rats who did not receive 5,7-DHT ($p > 0.05$, Table 1).

Bilateral 6-OHDA injection into the MFB, without prior desipramine treatment, dramatically and selectively decreased NE tissue content in the cortex (one-way Anova, $F = 3.580$, $p = 0.015$), by 72.2% in DA/NE-depleted rats compared to sham rats ($p = 0.042$) and by 68% in DA/NE/5-HT-depleted rats ($p = 0.017$). However, as expected, this lesion procedure did not affect the tissue level of NE in DA and DA/5-HT-depleted rats ($p > 0.05$, Table 1).

Bilateral 5,7-DHT injection selectively decreased 5-HT tissue content in the cortex (one-way Anova, $F = 3.429$, $p=0.019$) by 94.3% in DA/5-HT-depleted rats compared to sham-operated rats ($p=0.028$) and by 76.5% in DA/NE/5-HT-depleted rats compared to sham-operated rats ($p=0.034$). However, 5,7-DHT lesion procedure did not change the tissue level of 5-HT in DA- and DA/NE-lesioned rats ($p>0.05$, Table 1).

Depleted groups	DA (ng/g)	NE (ng/g)	5-HT (ng/g)
Sham (n=12)	5288 ± 160	158.6 ± 35.6	116.6 ± 26.6
DA (n=8)	148.8 ± 42***	126.3 ± 24	93.3 ± 27.7
DA/NE (n=8)	118.5 ± 31.4***	43.7 ± 10.7***	75.6 ± 23.3
DA/5-HT (n=12)	75.7 ± 28.2***	92.4 ± 8.7	5.6 ± 2.5***
DA/NE/5-HT (n=9)	140.7 ± 32.2***	50.3 ± 11.5***	27.4 ± 6.4**

Table 1. Neurochemical analysis of treatment induced selective lesions of DA, NE and 5-HT neurons. Tissue contents of striatal DA and frontal cortex NE and 5-HT measured by HPLC in sham rats (n=12), DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5-HT-lesioned rats (n=12) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9). Values are concentrations in ng/g of wet tissue presented as the mean ± SEM; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham-operated rats.

Effects of bilateral monoamine depletions on global locomotor activity (openfield)

Bilateral DA depletion alone or combined with NE or/and 5-HT significantly affected locomotor activity (One-way ANOVA, $F=6.628$, $p<0.001$; Fig. 2A). Indeed, bilateral DA depletion significantly decreased the distance of locomotor activity in the open-field test by 25% compared to sham-operated rats ($p=0.003$). Additional NE or 5-HT or combined NE and 5-HT depletions did not potentiate the motor impairment induced by DA depletion alone. Indeed, the percentage decrease of the score of locomotor activity was of 22% in rats with combined depletions of DA and NE, of 28% in rats with combined depletions of DA and 5-

HT and of 24% in rats with combined depletions of the three monoamines ($p>0.05$ compared to DA-depleted animals; $p=0.003$, $p<0.001$ and $p=0.003$ respectively compared to sham rats).

Likewise, bilateral DA neuron degeneration alone or combined with that of NE and/or 5-HT significantly affected the speed of locomotor activity (One-way ANOVA, $F=8.718$, $p<0.001$, Fig. 2B). Indeed, bilateral DA depletion significantly decreased the velocity in the open-field test by 35% compared to sham-operated rats ($p<0.001$). Additional NE or 5-HT or combined NE and 5-HT depletions did not induce any potentiation of the motor impairment induced by DA depletion alone. Indeed, the percentage decrease of the velocity was of 28% in rats with combined depletions of DA and NE, of 43% in rats with combined depletions of DA and 5-HT and of 22% in rats with combined depletions of the three monoamines ($p>0.05$ compared to DA-depleted animals; $p=0.004$, $p<0.001$ and $p=0.019$ respectively compared to sham rats).

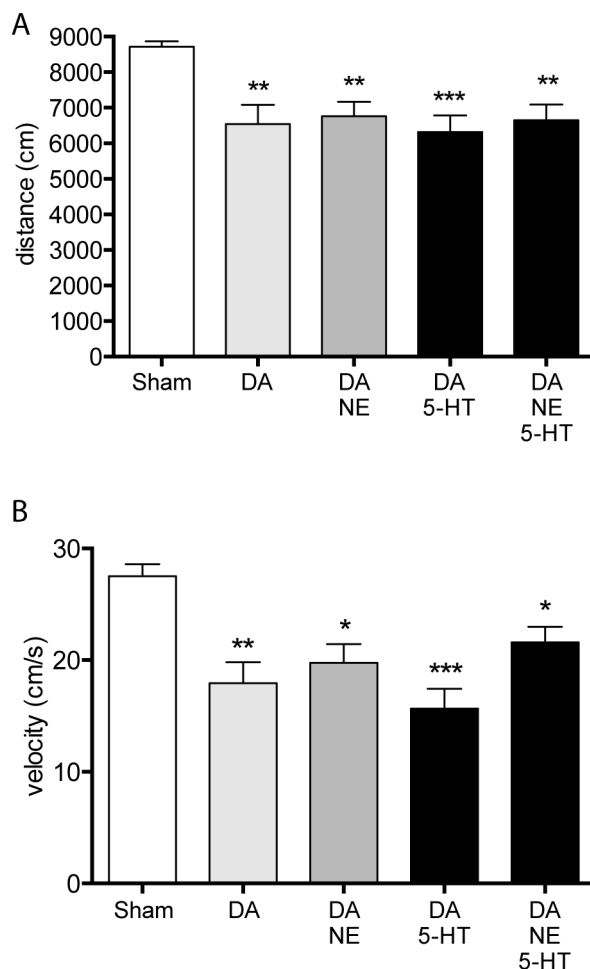


Figure 2. Bilateral monoaminergic

depletion induced motor disabilities.

Spontaneous locomotor activity is measured with an open-field in sham rats (n=12), DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5-HT-lesioned rats (n=12) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9).

Histogram A represents the number of horizontal movements recorded during 10 minutes. Histogram B represents the velocity recorded during 10 minutes. Values are the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham.

Effects of bilateral monoamine depletions on gait (Catwalk) :

Stride length

The stride length was similar between front and hind paws in all rat groups (Fig. 3A) but bilateral DA depletion alone or combined with NE or/and 5-HT significantly affected the gait pattern (One-way ANOVA, $F=8.949$, $p < 0.001$ and $F=10.09$, $p < 0.001$ respectively; Fig. 3A). Indeed, bilateral DA-lesioned rats took significantly shorter steps than sham-operated rats ($p_{front}=0,001$ and $p_{hind}=0,004$). NE or 5-HT or combined NE and 5-HT depletions did not potentiate the gait impairment ($p > 0.05$ compared to DA-lesioned animals; $p_{front} < 0.001$ and $p_{hind} < 0.001$; $p_{front} < 0.001$ and $p_{hind} < 0.001$; $p_{front}=0,004$ and $p_{hind}=0,002$, respectively compared to sham-operated rats).

Swing speed

The swing speed was similar between front and hind paws in all groups (Fig. 3B). Bilateral DA cell lesion alone did not affect the speed ($p_{front}=0,064$ and $p_{hind}=0,067$). However, interestingly, bilateral DA depletion combined with NE or/and 5-HT significantly affected the speed of the gait (one-way Anova, $F=7,751$, $p<0.001$ and $F=8,109$, $p<0.001$ respectively ; Fig. 4B). Indeed, additional NE, 5-HT or combined NE and 5-HT cell lesions significantly slowed down the gait compared to sham-operated rats ($p_{front}<0.015$ and $p_{hind}<0.005$; $p_{front}<0.001$ and $p_{hind}<0.001$; $p_{front}=0,037$ and $p_{hind}=0,011$, respectively compared to sham-operated rats).

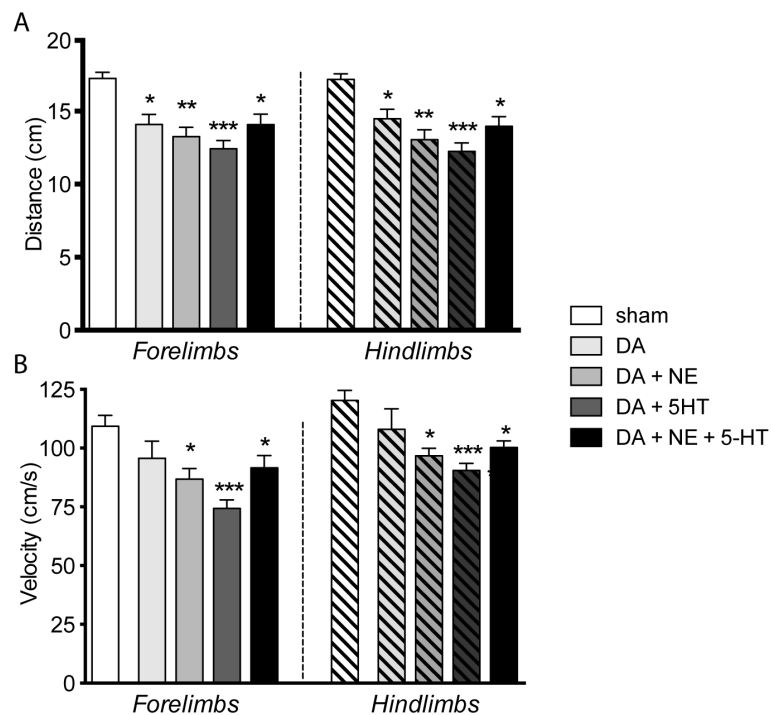


Figure 3. NE and 5-HT lesions are involved in slowness movements. Static and dynamic paw parameters are measured with a catwalk in sham rats (n=12), DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5-HT-lesioned rats (n=12) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9). Histogram A represents the stride length. Histogram B represents the swing speed. Values are the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham.

Effects of bilateral monoaminergic cell degeneration on motor performance (CRTT Skinnerbox) :

Motor time

Bilateral DA depletion alone did not significantly affect the motor performance ($p=0.076$) in the skinner box, but a tendency to increase the motor time was observed. However, interestingly, bilateral DA depletion combined with NE or/and 5-HT significantly affected motor performance (One-way ANOVA, $F=3.369$, $p=0.002$; Fig. 4A). Indeed, additional NE or 5-HT or combined NE and 5-HT depletions decreased motor time compared to sham-operated rats ($p=0.042$, $p=0.048$ and $p=0.024$, respectively).

Reaction time

Bilateral monoamine depletions did not significantly affect the reaction time (One-way ANOVA, $F=1.680$, $p=0.174$; Fig. 4B) although we observed a tendency to an increase of this parameter in the rats of all lesioned groups.

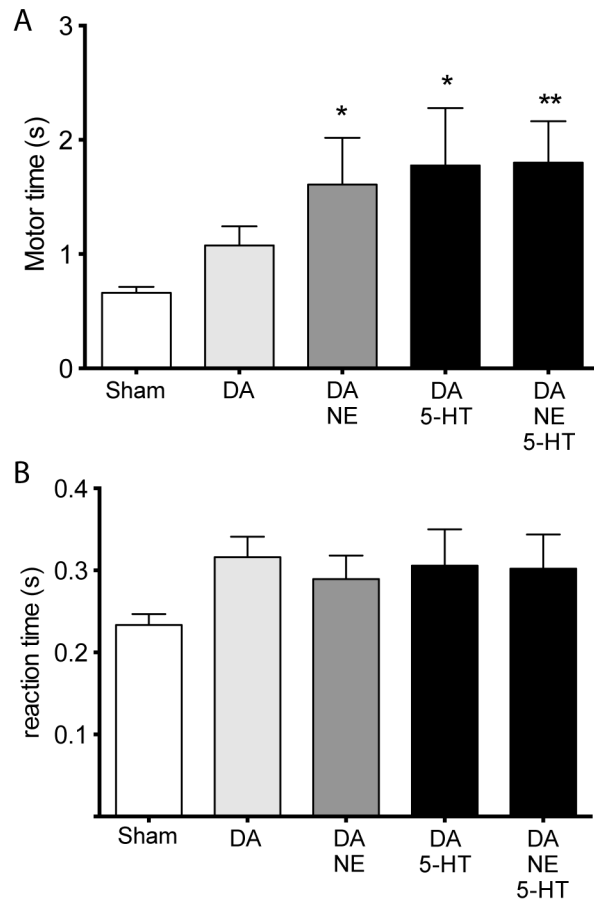


Figure 4: NE and 5-HT cell lesions are involved in some motor impairments.

Performance in the choice reaction time task (CRTT) of the skinner box in sham rats (n=12), DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5-HT-lesioned rats (n=12) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9). Histogram A represents the motor time and B represents the reaction time. Values (in sec) are the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; in comparison with sham.

Effects of bilateral monoamine depletions on the firing activity of STN neurons

Bilateral DA depletion alone or combined with NE and/or 5-HT did not modify the firing rate of STN neurons (One-way Anova, $F=2,268$, $p=0,067$) as previously reported (Belujon *et al.*, 2007; Delaville *et al.*, 2012) (Fig. 4A).

Concerning the firing pattern, the bilateral DA depletion alone or combined with NE and/or 5-HT significantly increased the proportion of STN neurons discharging with bursts and irregular patterns compared to sham-operated rats (χ^2 test, $X^2=193.20$, $df=8$, $p<0.001$). Moreover, the additional depletion of 5-HT potentiated the bursty pathological activity of bilateral 6-OHDA rats ($X^2=18,499$, $df=2$, $p<0,001$, Fig. 4B).

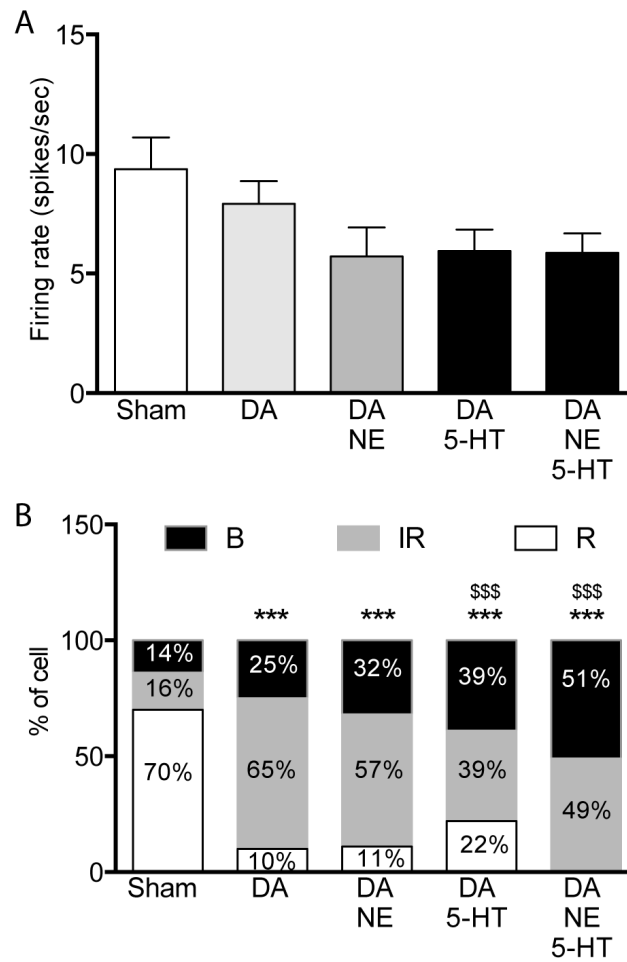


Figure 4 : Effect of monoaminergic cell lesions on the spontaneous firing rate and pattern of discharge of STN neurons. Histogram A represents the mean \pm SEM of the firing rate (spikes/sec) of STN neurons recorded in each experimental group : sham rats (n=30), DA-lesioned rats (n=25), DA and NE-lesioned rats (n=22), DA and 5-HT-lesioned rats (n=26) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=24). Histogram B represents the firing pattern distribution of STN neurons discharging in a regular (R, white portion) and irregular (IR, grey portion) manner or with burst (B, black portion). *** $p < 0.001$ in comparison with sham and \$\$\$ $p < 0.001$ in comparison with DA-lesioned rats.

Discussion

The present study provides evidence that DA neuron degeneration in the rat induced global locomotor deficit and gait disturbances. Although additional lesions of NE and/or 5-HT neurons had no impact on these deficits, NE and 5-HT are necessary to induce motor disturbances related to akinesia and bradykinesia. Our data add evidence that the degeneration of NE and 5-HT neurons in the LC and DR plays an important role in the pathophysiology of precise motor deficits observed in advanced stage of PD. Our model showed a strong bilateral DA depletion in the striatum (>80%), and NE in the frontal cortex (>70%), with a moderate depletion of 5-HT in the frontal cortex (>50%) approaching the levels of monoamine depletions reported in PD patients when the motor symptoms are present (McNamara *et al.*, 2006; Halliday *et al.*, 1990).

We showed that bilateral DA depletion induced locomotor impairments with a decrease in the spontaneous locomotor activity as well as the velocity of movements in the Open field. Consistent with other studies, bilateral 6-OHDA lesion induced motor deficits (Sakai & Gash, 1994; Paille *et al.*, 2007). Sakai and Gash (1994) demonstrated that the spontaneous locomotor activity was reduced after bilateral lesions of the SNc. It has been shown that the spontaneous locomotor activity remained within the usual range until neuronal loss in the SNc exceeded 80% (Leenders *et al.*, 1990); (Bernheimer *et al.*, 1973). The additional cell depletion of NE or/and 5-HT neurons did not aggravate the locomotor impairments, in support of our previous results obtained in the unilateral DA depleted rat model (Delaville *et al.*, 2012) confirming the DA origin of locomotor deficits.

Although tests of simple motor behavior, like the Open field, permits to characterize easily the global locomotor activity (Francardo *et al.*, 2011; Heuer *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012), more complex functions that can allow more precise dissection of the motor impairment can be studied. The catwalk test permits to study gait disorders in PD, one component of the axial

disorders observed in PD patients. Indeed, short steps with a forward-leaning stance are diagnostic criteria for PD in the early stages (Devos *et al.*, 2010). Gait impairments are characterized by spatial and temporal dysfunction (Westin *et al.*, 2012). Indeed, a look at the static gait parameter (stride length) showed that the bilateral DA depletion induced gait impairment. Indeed, the stride length was reduced by approximately 17% for both forelimbs and hind limbs and not aggravated by the additional monoaminergic depletions. Here again, the DA origin of the motor symptoms is illustrated. This symptom is similar to the clinical situation, in which PD patients make smaller steps (Kemoun & Defebvre, 2001). The variability of stride length, more marked in parkinsonian patients, increased as a function of the clinical stages of Hoehn and Yahr (Hoehn & Yahr, 2001; Blin *et al.*, 1990). Indeed, gradually, the gait is composed of small steps without a wide base and difficulties occur for starting up (delay of gait initiation) (Kemoun & Defebvre, 2001). However, the additional NE or/and 5-HT depletion is necessary to induce the decrease of the speed of the paw during the swing phase. We then observed a slow speed, which was not found in rats with only DA lesion. Moreover, the additional NE or/and 5-HT depletion is necessary to induce a decrease of motor time in the Skinner box. Indeed, here again, the decline of time of movement execution is not detected in rats with only DA loss. Another study using DA lesion associated with that of NE showed impairment of movement time (Lindgren *et al.*, 2014) but with a not significative impact probably relative to the only unilateral lesion performed in rats. Moreover, Lindgren et al (2014) showed that NE might also play an important role in contributing to the attentive performance in the CRTT. However, it is unlikely that the decrease in motor time is a consequence of decrease in attentive performance as there is no difference between our different groups of rats in reaction time parameter. According to these results, we suggest that the additional NE or/and 5-HT depletions could trigger bradykinesia and akinesia in rats like these two depletions induced slowness of movements in the catwalk

and the slowness of movement initiation in the Skinner box, respectively.

Together, the global motor deficits illustrated by the spontaneous locomotor activity, the velocity and the gait pattern disturbances we observed in the rats with bilateral DA depletion are similar to those observed in patients when 70-80% of the normal striatal DA level is lost (Hornykiewicz, 1975; McNamara *et al.*, 2006). However, investigating the parameters of fine motor skills like the swing speed or the motor time showed that the bilateral DA depletion alone is not sufficient to trigger akinesia and bradykinesia as the slowness of movements appeared when additional NE or/and 5-HT depletions occurred. Interestingly, gait hypokinesia is the first to appear in PD patients and is responsible for the decrease in velocity (Moreau *et al.*, 2010). Then, our study could be consistent with the Braak's theory (Braak & Del Tredici, 2008), since the first motor symptoms appear when NE or/and 5-HT cells are lost in addition to the DA neuron degeneration. Indeed, Braak proposed a progressive caudo-rostral neuron degeneration affecting the monoaminergic systems at the origin of PD symptomatology. NE neurons of the LC would be the first altered system, followed by the degeneration of DR 5-HT neurons (Hornung, 2003), with these two monoaminergic systems involved in the manifestation of motor symptoms. Indeed, the L-dopa-resistance in gait disorders may be linked to the propagation of neurodegeneration to non-dopaminergic structures directly involved in gait control. The NEergic system is rapidly and severely affected, leading to a major motor impact. Indeed, PD presents a wider spectrum of motor symptoms when both DA and NE deficiency are combined (Narabayashi *et al.*, 1991). Several studies have also reported the involvement of the LC NE pathway in freezing (Sandyk, 1996; Ringendahl & Sierla, 1997; Devos *et al.*, 2010), postural instability and akinesia (Narabayashi *et al.*, 1991). More recently, a study showed that the NE neuron degeneration in 6-OHDA rats contributes to motor impairment, notably skilled paw use tasks (Shin *et al.*, 2014). Moreover, neurodegenerative damage to the 5-HTergic raphe nuclei appears less severe, although 5-

HT/DA interactions are numerous and complex. Indeed, the 5-HTergic modulation of the basal ganglia may be relevant to treat PD and the motor complications induced by chronic treatment with L-Dopa (Carta *et al.*, 2007; Eskow *et al.*, 2009; Rylander *et al.*, 2010). However, the relative implication of NE and 5-HT cannot be illustrated in our study since there is no difference between the two groups with the DA depletion combined to the NE or to the 5-HT depletions. Moreover, the combined DA, NE and 5-HT depletions did not show any aggravation of the motor impairments. Interestingly, we observed a dramatic difference in the percentage of 5-HT depletion between the rat groups with DA and 5-HT depletions and with the three monoaminergic system depletions together even though the protocol was exactly the same. This result confirms the interaction between the monoaminergic systems. Indeed, previous anatomical and electrophysiological studies have shown the existence of reciprocal and functional relationships between the three monoaminergic systems (Aston-Jones *et al.*, 1991; Guiard *et al.*, 2008) although at this depletion level the difference of 5-HT depletion did not influence the motor impairments of the rat groups with DA/5-HT and with DA/NE/5-HT. The hypothesis of a convergence of the three monoamines on the same circuit involved in motor behavior is compatible with our electrophysiological data showing that in all the depleted groups an increase in the number of STN neurons discharging with burst and irregular patterns was observed compared to sham-operated rats. These results are consistent with our previous study (Delaville *et al.*, 2012). Indeed, *in vitro* and *in vivo* electrophysiological studies have shown that the three monoamines modulate the electrical activity of STN neurons (Arcos D, 2003; Baufreton *et al.*, 2005; Delaville *et al.*, 2012b; Belujon *et al.*, 2007). Moreover, we also show that the additional 5-HT depletion increased the proportion of STN neurons discharging with burst patterns, which was paralleled with the manifestation of akinesia and bradykinesia, observed in rats with the additional 5-HT depletion.

The present study provides new insights into the respective roles of monoamines in the manifestation of parkinsonian-like motor symptoms in parallel with the change in subthalamic neuronal activity. We showed the DA origin of locomotor and gait disturbances and provides the first evidence that NE and 5-HT lesions are involved in akinesia and bradykinesia. Our data add evidence that PD should be modeled as a monoaminergic pathology.

Bibliography

- Arcos D, S.A., Nuñez A, Flores G, Aceves J, Arias-Montaña JA. (2003) Noradrenaline increases the firing rate of a subpopulation of rat subthalamic neurones through the activation of alpha 1-adrenoceptors. *Neuropharmacology*.
- Aston-Jones, G., Chiang, C. & Alexinsky, T. (1991) Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Progress in brain research*, **88**, 501-520.
- Baufreton, J., Zhu, Z.T., Garret, M., Bioulac, B., Johnson, S.W. & Taupignon, A.I. (2005) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**, 1771-1777.
- Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B. & Benazzouz, A. (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 9595-9606.
- Benabid, A.L., Koudsie, A., Benazzouz, A., Fraix, V., Ashraf, A., Le Bas, J.F., Chabardes, S. & Pollak, P. (2000) Subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Archives of medical research*, **31**, 282-289.
- Benazzouz, A., Breit, S., Koudsie, A., Pollak, P., Krack, P. & Benabid, A.L. (2002) Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **17 Suppl 3**, S145-149.
- Benazzouz, A., Gross, C., Feger, J., Boraud, T. & Bioulac, B. (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *The European journal of neuroscience*, **5**, 382-389.
- Bergman, H., Wichmann, T. & DeLong, M.R. (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, **249**, 1436-1438.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. & Seitelberger, F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the neurological sciences*, **20**, 415-455.
- Blin, O., Ferrandez, A.M. & Serratrice, G. (1990) Quantitative analysis of gait in Parkinson patients: increased variability of stride length. *Journal of the neurological sciences*, **98**, 91-97.
- Boraud, T., Bezard, E., Guehl, D., Bioulac, B. & Gross, C. (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain research*, **787**, 157-160.

- Boyajian, C.L., Loughlin, S.E. & Leslie, F.M. (1987) Anatomical evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **241**, 1079-1091.
- Braak, H. & Del Tredici, K. (2008) Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. *Experimental neurology*, **212**, 226-229.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N. & Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, **24**, 197-211.
- Burbaud, P., Gross, C., Benazzouz, A., CousseMACq, M. & Bioulac, B. (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Experimental brain research*, **105**, 48-58.
- Canteras, N.S., Shammah-Lagnado, S.J., Silva, B.A. & Ricardo, J.A. (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain research*, **513**, 43-59.
- Cao, C., Temel, Y., Blokland, A., Ozen, H., Steinbusch, H.W., Vlamings, R., Nguyen, H.P., von Horsten, S., Schmitz, C. & Visser-Vandewalle, V. (2006) Progressive deterioration of reaction time performance and choreiform symptoms in a new Huntington's disease transgenic ratmodel. *Behavioural brain research*, **170**, 257-261.
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D. & Bjorklund, A. (2007) Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 1819-1833.
- Chen, L., Liu, J., Zhang, Q.J., Feng, J.J., Gui, Z.H., Ali, U., Wang, Y., Fan, L.L., Hou, C. & Wang, T. (2011) Alterations of emotion, cognition and firing activity of the basolateral nucleus of the amygdala after partial bilateral lesions of the nigrostriatal pathway in rats. *Brain research bulletin*, **85**, 329-338.
- Chetrit, J., Ballion, B., Laquitaine, S., Belujon, P., Morin, S., Taupignon, A., Bioulac, B., Gross, C.E. & Benazzouz, A. (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PloS one*, **4**, e6208.
- De Deurwaerdere, P. & Chesselet, M.F. (2000) Nigrostriatal lesions alter oral dyskinesia and c-Fos expression induced by the serotonin agonist 1-(m-chlorophenyl)piperazine in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 5170-5178.
- Del Tredici, K., Rub, U., De Vos, R.A., Bohl, J.R. & Braak, H. (2002) Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **61**, 413-426.

- Delaville, C., Navailles, S. & Benazzouz, A. (2012b) Effects of noradrenaline and serotonin depletions on the neuronal activity of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata in experimental parkinsonism. *Neuroscience*, **202**, 424-433.
- Delaville, C., Chetrit, J., Abdallah, K., Morin, S., Cardoit, L., De Deurwaerdere, P. & Benazzouz, A. (2012) Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiology of disease*, **45**, 763-773.
- Delaville, C., Deurwaerdere, P.D. & Benazzouz, A. (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Frontiers in systems neuroscience*, **5**, 31.
- Delwaide, P.J., Sabbatino, M. & Delwaide, C. (1986) Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *Journal of neural transmission. Supplementum*, **22**, 129-139.
- Devos, D., Defebvre, L. & Bordet, R. (2010) Dopaminergic and non-dopaminergic pharmacological hypotheses for gait disorders in Parkinson's disease. *Fundamental & clinical pharmacology*, **24**, 407-421.
- Devos, D., Labyt, E., Derambure, P., Bourriez, J.L., Cassim, F., Guieu, J.D., Destee, A. & Defebvre, L. (2003) Effect of L-Dopa on the pattern of movement-related (de)synchronisation in advanced Parkinson's disease. *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology*, **33**, 203-212.
- Dowd, E. & Dunnett, S.B. (2004) Deficits in a lateralized associative learning task in dopamine-depleted rats with functional recovery by dopamine-rich transplants. *The European journal of neuroscience*, **20**, 1953-1959.
- Dowd, E. & Dunnett, S.B. (2005) Comparison of 6-hydroxydopamine-induced medial forebrain bundle and nigrostriatal terminal lesions in a lateralised nose-poking task in rats. *Behavioural brain research*, **159**, 153-161.
- Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr*, **38**, 1236-1239.
- Eskow, K.L., Dupre, K.B., Barnum, C.J., Dickinson, S.O., Park, J.Y. & Bishop, C. (2009) The role of the dorsal raphe nucleus in the development, expression, and treatment of L-dopa-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *Synapse*, **63**, 610-620.
- Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H. & Cenci, M.A. (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **42**, 327-340.
- German, D.C., Manaye, K.F., White, C.L., 3rd, Woodward, D.J., McIntire, D.D., Smith, W.K., Kalaria, R.N. & Mann, D.M. (1992) Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Annals of neurology*, **32**, 667-676.

- Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W. & Kimura, M. (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, **265**, 1826-1831.
- Guiard, B.P., El Mansari, M., Merali, Z. & Blier, P. (2008) Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol*, **11**, 625-639.
- Guridi, J. & Obeso, J.A. (2001) The subthalamic nucleus, hemiballismus and Parkinson's disease: reappraisal of a neurosurgical dogma. *Brain : a journal of neurology*, **124**, 5-19.
- Halliday, G.M., Blumbergs, P.C., Cotton, R.G., Blessing, W.W. & Geffen, L.B. (1990) Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain research*, **510**, 104-107.
- Heuer, A., Smith, G.A., Lelos, M.J., Lane, E.L. & Dunnett, S.B. (2012) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behavioural brain research*, **228**, 30-43.
- Hoehn, M.M. & Yahr, M.D. (2001) Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology*, **57**, S11-26.
- Hornung, J.P. (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of chemical neuroanatomy*, **26**, 331-343.
- Hornykiewicz, O. (1975) Brain monoamines and Parkinsonism. *Psychopharmacology bulletin*, **11**, 34-35.
- Janssen, M.L., Zwartjes, D.G., Tan, S.K., Vlamings, R., Jahanshahi, A., Heida, T., Hoogland, G., Steinbusch, H.W., Visser-Vandewalle, V. & Temel, Y. (2012) Mild dopaminergic lesions are accompanied by robust changes in subthalamic nucleus activity. *Neuroscience letters*, **508**, 101-105.
- Kaneoke, Y. & Vitek, J.L. (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *Journal of neuroscience methods*, **68**, 211-223.
- Kemoun, G. & Defebvre, L. (2001) [Gait disorders in Parkinson disease. Clinical description, analysis of posture, initiation of stabilized gait]. *Presse medicale*, **30**, 452-459.
- Kish, S.J. (2003) Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Advances in neurology*, **91**, 39-49.

- Klinkenberg, I. & Blokland, A. (2011) A comparison of scopolamine and biperiden as a rodent model for cholinergic cognitive impairment. *Psychopharmacology*, **215**, 549-566.
- Leenders, K.L., Salmon, E.P., Tyrrell, P., Perani, D., Brooks, D.J., Sager, H., Jones, T., Marsden, C.D. & Frackowiak, R.S. (1990) The nigrostriatal dopaminergic system assessed in vivo by positron emission tomography in healthy volunteer subjects and patients with Parkinson's disease. *Archives of neurology*, **47**, 1290-1298.
- Lindgren, H.S., Demirbugen, M., Bergqvist, F., Lane, E.L. & Dunnett, S.B. (2014) The effect of additional noradrenergic and serotonergic depletion on a lateralised choice reaction time task in rats with nigral 6-OHDA lesions. *Experimental neurology*, **253**, 52-62.
- McNamara, P., Durso, R. & Harris, E. (2006) Life goals of patients with Parkinson's disease: A pilot study on correlations with mood and cognitive functions. *Clinical rehabilitation*, **20**, 818-826.
- Mink, J.W. & Thach, W.T. (1991) Basal ganglia motor control. III. Pallidal ablation: normal reaction time, muscle cocontraction, and slow movement. *Journal of neurophysiology*, **65**, 330-351.
- Moreau, C., Cantiniaux, S., Delval, A., Defebvre, L. & Azulay, J.P. (2010) [Gait disorders in Parkinson's disease: and pathophysiological approaches]. *Revue neurologique*, **166**, 158-167.
- Morris, M.E., Iansek, R., Matyas, T.A. & Summers, J.J. (1994) The pathogenesis of gait hypokinesia in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*, **117 (Pt 5)**, 1169-1181.
- Narabayashi, H., Yokochi, F., Ogawa, T. & Igakura, T. (1991) [Analysis of L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine effect on motor and psychological symptoms in Parkinson's disease]. *No to shinkei = Brain and nerve*, **43**, 263-268.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C. & De Deurwaerdere, P. (2010) Chronic L-DOPA therapy alters central serotonergic function and L-DOPA-induced dopamine release in a region-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **41**, 585-590.
- Ni, Z.G., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D.M., Benabid, A.L. & Benazzouz, A. (2001) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain research*, **899**, 142-147.
- Paille, V., Henry, V., Lescaudron, L., Brachet, P. & Damier, P. (2007) Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **22**, 533-539.

- Paxinos, G. & Watson, C. (1996) The Rat Brain in Stereotatic Coordinates. *Academic Press, San Diego*.
- Politis, M. & Niccolini, F. (2014) Serotonin in Parkinson's disease. *Behavioural brain research*.
- Ringendahl, H. & Sierla, T. (1997) [Freezing phenomenon in Parkinson disease]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, **65**, 435-445.
- Rylander, D., Iderberg, H., Li, Q., Dekundy, A., Zhang, J., Li, H., Baishen, R., Danysz, W., Bezard, E. & Cenci, M.A. (2010) A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys. *Neurobiology of disease*, **39**, 352-361.
- Sakai, K. & Gash, D.M. (1994) Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain research*, **633**, 144-150.
- Sandyk, R. (1996) Freezing of gait in Parkinson's disease is improved by treatment with weak electromagnetic fields. *The International journal of neuroscience*, **85**, 111-124.
- Shin, E., Rogers, J.T., Devoto, P., Bjorklund, A. & Carta, M. (2014) Noradrenaline neuron degeneration contributes to motor impairments and development of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, **257**, 25-38.
- Smith, G.A., Heuer, A., Dunnett, S.B. & Lane, E.L. (2012) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting l-DOPA-induced dyskinesia. *Behavioural brain research*, **226**, 281-292.
- Steinbusch, H.W. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, **6**, 557-618.
- Tai, C.H., Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B., Gross, C. & Benazzouz, A. (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridges neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**, 1820-1830.
- Thobois, S., Ardouin, C., Lhomme, E., Klinger, H., Lagrange, C., Xie, J., Fraix, V., Coelho Braga, M.C., Hassani, R., Kistner, A., Juphard, A., Seigneuret, E., Chabardes, S., Mertens, P., Polo, G., Reilhac, A., Costes, N., LeBars, D., Savasta, M., Tremblay, L., Quesada, J.L., Bosson, J.L., Benabid, A.L., Broussolle, E., Pollak, P. & Krack, P. (2010) Non-motor dopamine withdrawal syndrome after surgery for Parkinson's disease: predictors and underlying mesolimbic denervation. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 1111-1127.

- Westin, J.E., Janssen, M.L., Sager, T.N. & Temel, Y. (2012) Automated gait analysis in bilateral parkinsonian rats and the role of L-DOPA therapy. *Behavioural brain research*, **226**, 519-528.
- Wilbur, R., Kulik, F.A. & Kulik, A.V. (1988) Noradrenergic effects in tardive dyskinesia, akathisia and pseudoparkinsonism via the limbic system and basal ganglia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **12**, 849-864.
- Zeef, D.H., Vlamings, R., Lim, L.W., Tan, S., Janssen, M.L., Jahanshahi, A., Hoogland, G., Prickaerts, J., Steinbusch, H.W. & Temel, Y. (2012) Motor and non-motor behaviour in experimental Huntington's disease. *Behavioural brain research*, **226**, 435-439.

Article 3

Faggiani et al., 2014
En préparation

**La lésion des neurones sérotoninergiques interfère avec
l'amélioration de l'anxiété induite par la Lévodopa et
altère l'activité neuronale du noyau basolatéral de
l'amygdale**

Résumé :

La maladie de Parkinson est caractérisée par la manifestation de symptômes moteurs principalement associés à la dégénérescence du système dopaminergique. Malgré l'accent mis sur les déficits moteurs, la maladie de Parkinson est également caractérisée par des symptômes non moteurs qui ne sont pas bien étudiés et ne sont donc pas bien traités. En effet, l'anxiété, dépendante du circuit des émotions et plus précisément du noyau basolatéral de l'amygdale, est retrouvée chez plus de 40% des patients. Alors que certaines études cliniques ont suggéré que l'anxiété pourrait être liée à la dégénérescence des neurones dopaminergiques, d'autres ont mis en évidence l'implication de la noradrénaline et de la sérotonine. Ici, nous avons étudié les effets de la lésion des systèmes dopaminergique, noradrénergique et sérotoninergique sur ce symptôme non moteur chez le rat. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'impact de ces lésions monoaminergiques sur l'effet de la Lévodopa. Enfin, nous avons étudié le rôle du noyau basolatéral de l'amygdale dans les effets observés. Nos résultats montrent que la lésion bilatérale des neurones dopaminergiques seuls induit un comportement anxieux qui n'est pas potentialisé par la lésion additionnelle des systèmes noradrénergique ou sérotoninergique. La Lévodopa a nettement inversé le comportement anxieux chez les animaux présentant une lésion bilatérale dopaminergique seule ou associée à la lésion noradrénergique. Ces résultats confirment le rôle crucial joué par la lésion DAergique dans la manifestation du trouble anxieux. Toutefois, l'amélioration induite par la Lévodopa est perdue par la lésion supplémentaire des neurones sérotoninergiques. Ces résultats confirment l'hypothèse que, à un stade avancé de la maladie, la conversion de la Lévodopa en dopamine a lieu dans les neurones sérotoninergiques et quand ces derniers sont lésés, la Lévodopa ne peut pas se convertir en dopamine pour jouer son rôle thérapeutique. Nous avons également mis en évidence le lien entre l'anxiété et l'activité neuronale du noyau basolatéral de l'amygdale. En effet, son activité électrique

augmente en parallèle avec l'amélioration du comportement anxieux induit par la Lévodopa chez les rats porteurs d'une lésion dopaminergique seule ou associée avec celle du système noradrénergique. Par contre, la perte d'efficacité de la Lévodopa sur l'anxiété chez les rats avec une lésion additionnelle du système sérotoninergique est associée à une absence de modification de l'activité électrique des neurones du noyau basolatéral de l'amygdale.

Notre étude met en évidence le rôle clé de la déplétion des systèmes monoaminergiques dans la Lévodopothérapie du trouble anxieux. Elle fournit la première preuve que la lésion sérotoninergique interfère avec l'amélioration de l'anxiété et aussi la réponse des neurones du noyau basolatéral de l'amygdale induites par la Lévodopa.

Lesioning serotonin cells interferes with Levodopa-induced improvement of anxiety and alters the neuronal activity of basolateral amygdala

Emilie Faggiani^{1,2}, Frederic Naudet^{1,2}, Abdelhamid Benazzouz^{1,2,*}

1. Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33076 Bordeaux, France.

2. CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33076 Bordeaux, France.

* Correspondence should be addressed to Dr. Abdelhamid Benazzouz, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

Telephone: +33 557 57 46 25; Fax: +33 556901421

E-mail: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr

Abstract

Despite the focus on motor deficits, Parkinson's disease is also characterized by non-motor symptoms, including anxiety, mediated by the basolateral amygdala (BLA), which is understudied and therefore is not well treated. Here, we first investigated the respective role of dopamine (DA), norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) in the manifestation of this non-motor symptom; second, whether these monoaminergic lesions can interfere with the effect of L-Dopa on anxiety; and finally, the role played by BLA in the observed effects. We induced selective lesions of the monoaminergic systems and we showed that bilateral DA neuron lesion alone induced anxiety disorder and that additional depletions of NE and/or 5-HT did not potentiate this anxiogenic effect. L-Dopa reversed anxiety behaviour in animals with bilateral DA lesion alone or combined with NE cell lesions. However, its improvement was lost by the additional lesion of 5-HT neurons. These results support the assumption that in the context of PD advanced stage, the conversion of L-Dopa to DA takes place in 5-HT neurons and that the lesion of 5-HT neurons compromised this conversion. We also showed a link between anxiety and the neuronal activity of BLA as the loss of efficacy of L-Dopa treatment on anxiety-like behavior was paralleled with the absence of effect on the electrical activity of BLA neurons. Our data highlight the key role of monoamine lesions in the therapy of anxiety. We provide the first evidence that lesioning 5-HT cells interferes with L-Dopa-induced improvement of anxiety and the responses of BLA neurons.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder characterized by the degeneration of dopamine (DA) neurons in the *pars compacta* of substantia nigra (SNc) (Ehringer & Hornykiewicz, 1960) at the origin of the cardinal motor symptoms of the disease. However, despite the focus on DA cell loss, PD is also characterized by the degeneration of 70% of norepinephrine (NE) cells in the locus coeruleus (German *et al.*, 1992) and 40-50% of serotonin (5-HT) cells in the dorsal raphe (Kish, 2003), which may contribute to the non-motor symptoms (Devos *et al.*, 2010; Zarow *et al.*, 2003). Anxiety is one of the non-motor disorders present in more than 40% of PD patients, (*for review Delaville et al.*, 2011). While some clinical studies have suggested that anxiety might be related to the degeneration of DA cells (Chaudhuri & Schapira, 2009; Eskow Jaunarajs *et al.*, 2010), others suggested the involvement of norepinephrine (NE) and/or serotonin (5-HT) cell loss (Andrade *et al.*, 2004; *for review*, Graeff, 2002). By using the unilateral 6-OHDA rat model of PD, Delaville and Colleagues (Delaville *et al.*, 2012) provided evidence for the exacerbation of behavioral deficits when NE and/or 5-HT depletions were combined with DA depletion, suggesting that PD should be modeled as a monoaminergic pathology. In the present study we extended this work by using the bilateral 6-OHDA rat model in which nigral DA lesion was combined with bilateral NE and/or 5-HT cell lesions.

Levodopa (L-Dopa) is the gold standard anti-parkinsonian treatment, which permits the restoration of dopaminergic transmission to improve the cardinal motor symptoms (Cotzias, 1968; Yahr *et al.*, 1969). However, the impact of L-Dopa on PD non-motor symptoms and its interaction with the monoaminergic systems are not clearly established. Recent studies provided biochemical evidence that 5-HT neurons are at the origin of the diffuse increase in DA neurotransmission induced by L-Dopa (Navailles *et al.*, 2010b). Moreover, other

investigations using metabolic mapping unravelled that non-motor domains of the basal ganglia and beyond play also a role in the mechanism of action of L-Dopa (Guigoni *et al.*, 2005). Indeed, the basolateral amygdala (BLA), as a part of the brain circuitry of emotion (Lalumiere, 2014), receives dense innervation from the DAergic and 5-HTergic systems, *for review* (Asan *et al.*, 2013) and sparse NEergic innervation (Fallon *et al.*, 1978). However, the efficacy of L-Dopa according to monoaminergic system lesions on anxiety and the changes in the neuronal activity of BLA is still not clearly established.

The present work was aimed to study, first, the respective role of combined bilateral lesions of the monoaminergic systems on anxiety behavior; second, whether these monoaminergic lesions can interfere with the effect of L-Dopa on anxiety; third, the role played by BLA in the observed effects.

Materials and Methods

Animals

Adult male Sprague-dawley rats, weighing 280-380 g were used for experiments. They were housed four per cage under artificial conditions of light (light/dark cycle, light on at 7:00 a.m.), temperature (24°C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All animal experiments were carried out in strict accordance with the Council Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol was approved by the local Committee on the Ethics of Animal Experiments “Comité d’éthique pour l’expérimentation animale Bordeaux” (Permit Numbers: 50120126-A and 50120136-A).

Drugs

6-hydroxydopamine (6-OHDA), ascorbic acid, desipramine, 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT), L-Dopa methylester-hydrochloride, benserazide-hydrochloride, and all anesthesia drugs were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Surgical procedure

After exclusion of non-lesioned animals, the rats were divided in the following five experimental groups: a DA-lesioned group (n=8); a DA and NE-lesioned group (n=9); a DA and 5-HT-lesioned (n=12); a DA, NE and 5HT-lesioned (n=9) and four sham groups with 6 rats for each of them associated with each lesioned group (n=6*4). In brief, one hour before surgery rats were injected with Temgesic (0.1 mg/kg, s.c.) for analgesia and rats from group without NE cell lesion were injected with desipramine (25 mg/kg, i.p.) to protect NE neurons from 6-OHDA toxicity. Throughout surgery, rats were anesthetized by ketamine/xylazine anesthesia (ketamine hydrochloride 75 mg/kg, i.p. and xylazine hydrochloride, 10 mg/kg, i.p.). Once anaesthesia was induced, the rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, France); the skull was exposed, and burr holes were made. The vehicle or toxins were slowly injected bilaterally in the median forebrain bundle (mfb) at the following coordinates relative to Bregma (in mm): AP: 2,8 ML: +/- 2, DV -8,4) (Paxinos & Watson, 1996). Vehicle was injected in each mfb in group sham (0.2% ascorbic acid dissolved in 0.9% saline), or 6-OHDA (2µl in each mfb or 1,675µg/µl; Sigma) in lesioned-groups and in addition 5,7-DHT (3µl in each mfb or 4µg/µl; Sigma) in groups with the 5-HT cell lesion. At the end of each injection, the cannula remained at the injection position for an additional 2 min and was then slowly withdrawn from the brain. After surgery, the rats were returned to the animal facility with food and water available ad libitum, and in addition, they were nursed *and* fed with

additional cereals, apple and baby milk during three days. The rats were given a 3-weeks recovery period before behavioural assessment was started.

Treatment protocol

L-Dopa at a therapeutical dose (12 mg/kg) was administrated 40 minutes before behavioural tests, best effect of L-Dopa, (Navailles *et al.*, 2010b). L-Dopa was dissolved in sterile NaCl 0.9 % preceded by 15 mg/kg benserazide to prevent its peripheral decarboxylation.

Evaluation of anxiety

The elevated plus maze (EPM) is considered as the most common test of anxiety-related behaviour in rodents (Carobrez & Bertoglio, 2005). The EPM consisted of two open arms (50 cm long 10 cm wide) and two walled arms (50 cm long 10 cm wide 38,5cm high) with an open roof, arranged around a central platform (10 cmx10 cm), with the two arms of each type placed opposite to each other. A camera was mounted 1.5 m above the EPM. Animals were placed onto the central platform, facing one of the open arms. The animal was allowed to explore the maze for 5 min. The following variable was measured : pourcentage of time in open arms and number of entries in the open arms extremities. The first time in the EPM corresponded to the baseline for anxiety according to the different groups. One week later, we performed the same test 40 min after L-Dopa injection to study the effect of the treatment.

Extracellular single-unit recordings

Extracellular single-unit recordings in the BLA were performed in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg i.p.) as previously reported (Ni *et al.*, 2001). A single glass micropipette electrode (impedance: 8–12 MΩ; aperture 0.5 μm) was filled with 4% Pontamine Sky Blue in 3 M NaCl and then lowered into the BLA according to the following stereotaxic coordinates

(in mm: AP: -0.9, L: -3, D: 4.5–7.5 (Paxinos & Watson, 1996). BLA neurons were recorded in each rat and were identified according to their firing activity as previously reported (Pare & Gaudreau, 1996).. Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass filtered (300–3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK), and transferred via a Powerlab interface (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio >3:1 was recorded and used for further investigation. Basal firing of neurons was recorded for 20 min to ascertain the stability of the discharge activity. At the end of each recording session, L-Dopa was injected intraperitoneally and the recorded BLA neuron was followed during 2 hours after the injection. Then, the recording site was marked by an electrophoretic injection (Iso DAM 80, WPI, Hertfordshire, UK) of Pontamine Sky Blue through the micropipette at a negative current of 20 μ A for 7 min. The location of the Pontamine Sky Blue dots was histologically verified as previously reported (Belujon *et al.*, 2007), and only brains with clear blue dots in the BLA were used for data analysis. A reconstruction of each recording site for each trajectory under microscope was carried out to consider only neurons recorded in the target structure.

Data analysis. The electrical activity of each neuron was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instruments), and firing parameters (interspike interval: 5-ms bin) were calculated using Neuroexplorer program (Alpha Omega, Nazareth, Israel). Firing rates were expressed as the averaged frequency of discharge calculated over the 20-min period of stabilization, and the value for each group is the mean \pm SEM (Burbaud *et al.*, 1995). Firing patterns were analyzed as previously described (Labarre *et al.*, 2008). Three patterns were determined: a regular pattern, with a discharge density distribution of spike train that follows a near-normal distribution; an irregular pattern, which follows a Poisson distribution; and a bursty pattern, with a discharge density histogram that follows two different

distributions (Kaneoke & Vitek, 1996). The number of cells discharging in each pattern was expressed as a percentage of the total number of the recorded neurons.

Validation of the recording site

After completion of the experiments, animals were sacrificed by intracardiac perfusion of 4% paraformaldehyde, the brains removed, frozen in isopentane at – 45 °C and stored at – 80 °C. Perfused brains were cryostat-cut into 20 µm coronal sections and acetylcholine esterase staining was used as previously described (Chetrit *et al.*, 2009) to determine the location of the Pontamine sky blue dots. Only brains in which the recording was shown to be in the BLA were used for data analysis.

Validation of DA, NE and 5-HT lesions

DA cell loss in the SNc, DA fibers loss in the striatum and NE cell loss in the LC were verified by immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase (TH) as previously described (Bouali-Benazzouz *et al.*, 2009). Sections of the SNc, striatum and LC were immuno-stained and only rats with a significant loss of TH immunoreactivity were used to analyze behavioral and electrophysiological data.

5-HT cell loss in the DR was verified by immunohistochemistry of 5-HT in the DR. Sections containing the DR were incubated for one night with a rabbit anti-5-HT antibody (1:50). The remaining steps including the secondary antibody, ABC-step, the visualization of the horseradish peroxide reaction product and only rats with a significant loss of 5-HT immunoreactivity were used to analyze behavioral and electrophysiological data.

The number of TH-immunoreactivity or 5-HT-immunoreactivity cells were obtained applying the optical fractionator (9, 34, 46, 47) unbiased stereological method using a Leica DM6000B microscope with Mercator Pro software (ExploraNova, version 7.9.8). Immunolabelled cells were counted by a blinded investigator on every 6th section for the SN and the DR and on

every 3th section for the LC previously used with stereological parameters adapted to SN (Counting frames: 80×80 μm, Spacing: 240×180 μm, number of sections: 5), to DR (Counting frames: 60×60 μm, Spacing: 80×120 μm, number of sections: 4) or to LC (Counting frames: 60×60 μm, Spacing: 80×100 μm, number of sections: 3).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Sigmaplot (Systat Software, San Jose, USA). For behavioral and immunohistochemical data, values between sham-operated and each lesioned-group were compared using a One-way Anova test. When normality test passed, we used a One-way Anova test followed, when significant, by a student Newman-Keuls multiple post-tests. When normality test failed, we used a Kruskal-Wallis test, when significant, followed by a post-hoc Dunn's method. The effect of L-Dopa in each lesioned group, before and after drug injection, was compared using a Wilcoxon paired t-test. For electrophysiological data, firing rates between all the groups were compared using a one-way Anova test. The effect of L-Dopa in lesioned-rats, before and after drug injection, was compared using a paired t-test. Firing patterns were analyzed using the method developed by (Kaneoke & Vitek, 1996) as previously described (Boraud *et al.*, 1998); (Tai *et al.*, 2003) to determine if HbL neurons discharged with regular, irregular or bursty pattern and the proportions of neurons according to their pattern were compared using a Chi² test.

Results

Validation of DA, NE and 5-HT lesions

Bilateral 6-OHDA injection into the MFB induced DA loss in the SNc as revealed by decreases in tyrosine hydroxylase immunoreactivity (TH-IR) (Kruskal-Wallis, $F=56,892$, $p<0,001$). Indeed, TH-IR is decreased in SNc of the four lesioned rats by 65% in DA-lesioned rats ($p<0,001$), by 72% in DA/NE –lesioned rats ($p<0,001$), by 68% in DA/5-HT-lesioned rats ($p<0,001$) and by 76% in DA/NE/5-HT-lesioned rats ($p<0,001$) (Fig. 1A and Fig. 2B-C'). Likewise, bilateral 6-OHDA injection into the MFB induced DA denervation throughout the striatum as revealed by decreases in TH-IR (Kruskal-Wallis, $F=55,143$, $p<0,001$). Indeed, the TH-IR is decreased by 73% in DA-lesioned rats ($p<0,001$), by 75,3% in DA/NE–lesioned rats ($p<0,001$), by 70,6% in DA/5-HT-lesioned rats ($p<0,001$) and by 84% in DA/NE/5-HT rats ($p<0,001$) (Fig. 1B and Fig. 2A-A').

Bilateral 6-OHDA injection into the MFB, without a prealable desipramine treatment, induced NE cell loss in the LC. Indeed, compared to sham rats, TH-IR cells decreased by 57% in DA/NE-lesioned rats and by 56% in DA/NE/5-HT-lesioned rats (One-way Anova, $F=63,684$, $p<0,001$; $p<0,001$ and $p<0,001$ respectively). (Fig. 1C and Fig. 2D-F'). However, TH-IR cells in the LC of the other groups was not affected.

Bilateral 5,7-DHT injection into the MFB induced specific loss of 5-HT neurons in the DR. Indeed, 5-HT-immunoreactive (5-HT-IR) cells in the DR decreased by 76% in DA/5-HT-depleted rats and by 66% in DA/NE/5-HT-lesioned rats (One-Way Anova, $F=9,245$, $p<0,001$, $p<0,001$ and $p<0,001$ respectively). (Fig. 1D and Fig. 2G-I').

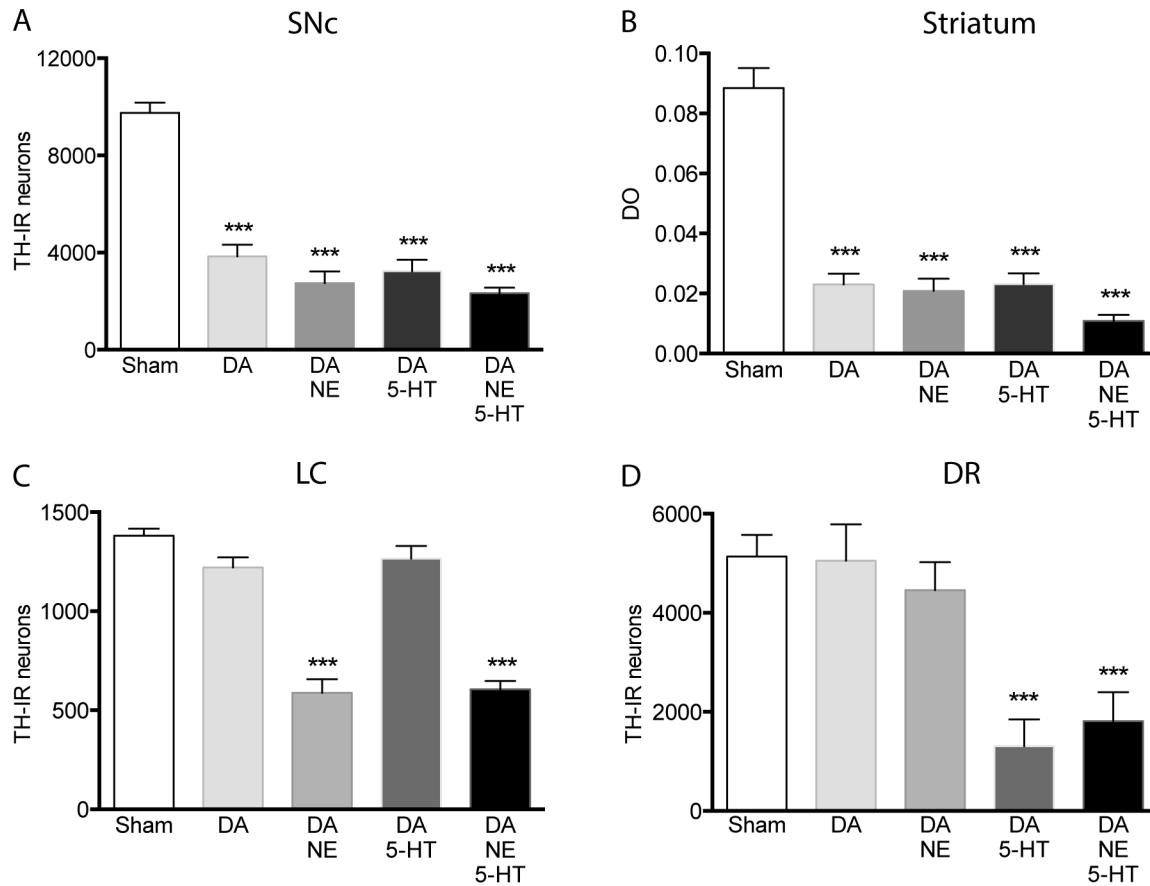


Figure 1: Treatment induced selective lesion of DA, NE and 5-HT cells. Quantification of the cell loss of immunolabelling in the SNc (A), the LC (C) and the DR (D) and TH staining of the striatum (B). Histograms A, C and D represent the TH-immunoreactivity loss compared to sham rats (n=24), DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=9), DA and 5-HT-lesioned rats (n=12) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9). Histogram B represents the optical density in all groups. Values are the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham (A, B, C) and with basal lesioned rats without L-Dopa (A', B', C'). SNc : substantia nigra *pars compacta* ; LC : locus coeruleus ; DR : dorsal raphe.

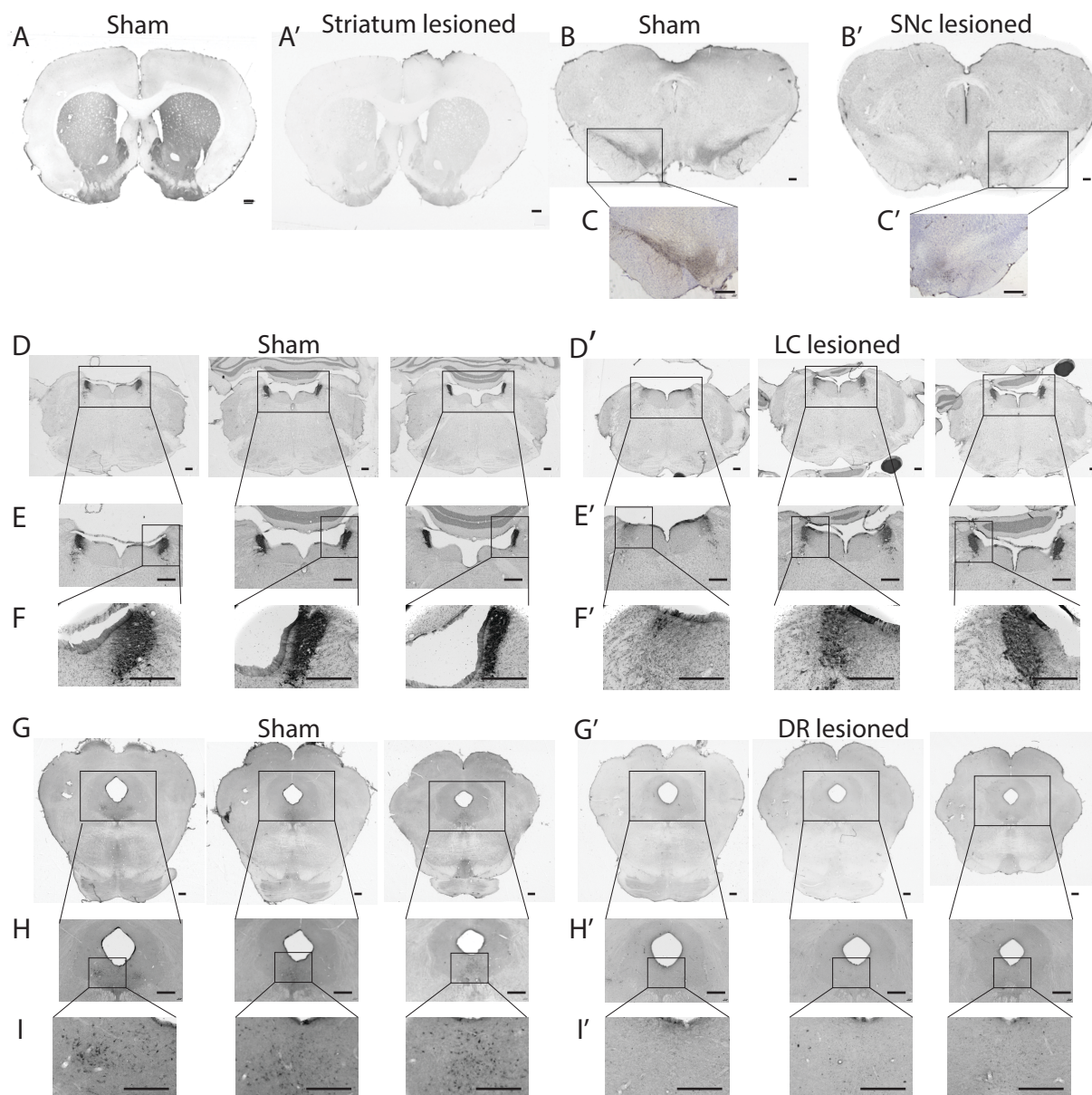


Figure 2 : Treatment induced selective lesion of DA, NE and 5-HT cells. Validation of the lesion model by tyrosine hydroxylase (TH) stained on coronal sections of striatum in sham rat (A) and lesioned rat (A'), of SNc in sham rat (B and C: zoom 2.5) and lesioned rat (B' and C'), of LC in sham rat (D, E : zoom 2.5 and F : zoom 10) and lesioned rat (D', E', F') and of DR in sham rat (G, H : zoom 2.5 and I : zoom 10) and lesioned rat (G', H' and I'). Scale bar : 1mm. For zoom 10, scale bar : 0,1 mm. SNc : substantia nigra *pars compacta* ; LC : locus coeruleus ; DR : dorsal raphe.

Effects of bilateral monoaminergic cell lesions on anxiety behavior

Bilateral DA lesion alone or combined with NE and/or 5-HT significantly affected the percentage of time spent in open arms of the elevated plus maze (One-way Anova, $F=3,085$ $p=0,030$; Fig. 3A). Indeed, bilateral DA lesion significantly decreased the percentage of time spent in open-arms by 41% compared to sham rats ($p=0,028$). Interestingly, additional lesions of NE and/or 5-HT did not potentiate the decrease of time spent in the open arms as the percentage decrease was of 55% ($p=0,018$) in rats with combined lesions of DA and NE, 52% ($p=0,024$) in rats with combined lesions of DA and 5-HT and 45% ($p=0,025$) in rats with combined lesions of the three monoamines.

Moreover, bilateral DA lesion alone or combined with NE and/or 5-HT significantly affected the number of entries in open arms extremities of the elevated plus maze (One-way Anova, $F=11,591$, $p<0,001$) (Fig. 3B). Indeed, bilateral DA lesion dramatically and significantly decreased the time spent in open-arms by 78% compared to sham rats ($p<0,001$). Interestingly, additional lesions of NE and/or 5-HT did not potentiate the decrease of time spent in the open arms as the percentage decrease was of 69% ($p<0,001$) in rats with combined lesions of DA and 5-HT, 80% ($p<0,001$) in rats with combined lesions of DA and NE and 60% ($p<0,001$) in rats with combined lesions of DA, 5-HT and NE.

Effects of L-Dopa on anxiety behavior

L-Dopa (12mg/kg) improved the anxiety behavior as it increased the percentage of time spent in open arms for rats with bilateral DA lesion (Wilcoxon paired t-test, $p=0,015$) and bilateral DA lesion combined with NE lesion (Wilcoxon paired t-test, $p<0,001$; Fig. 3A').

Interestingly, L-Dopa had no effect anymore since additional 5-HT lesion (Wilcoxon paired t-test, $p=0,656$ in rats with the DA and 5-HT lesions and $p=0,183$ in rats with the three lesions) (Fig. 3A').

Moreover, L-Dopa increased the number of entries in open arms extremities for rats with bilateral DA lesion (Wilcoxon paired t-test, $p=0,043$) and bilateral DA lesion combined with NE lesion (Wilcoxon paired t-test, $p=0,014$) (Fig. 3B'). Here again, L-Dopa had no effect anymore since additionnal 5-HT lesion (Wilcoxon paired t-test, $p=0,321$ in rats with the DA and 5-HT lesions and $p=0,063$ in rats with the three lesions) (Fig. 3B').

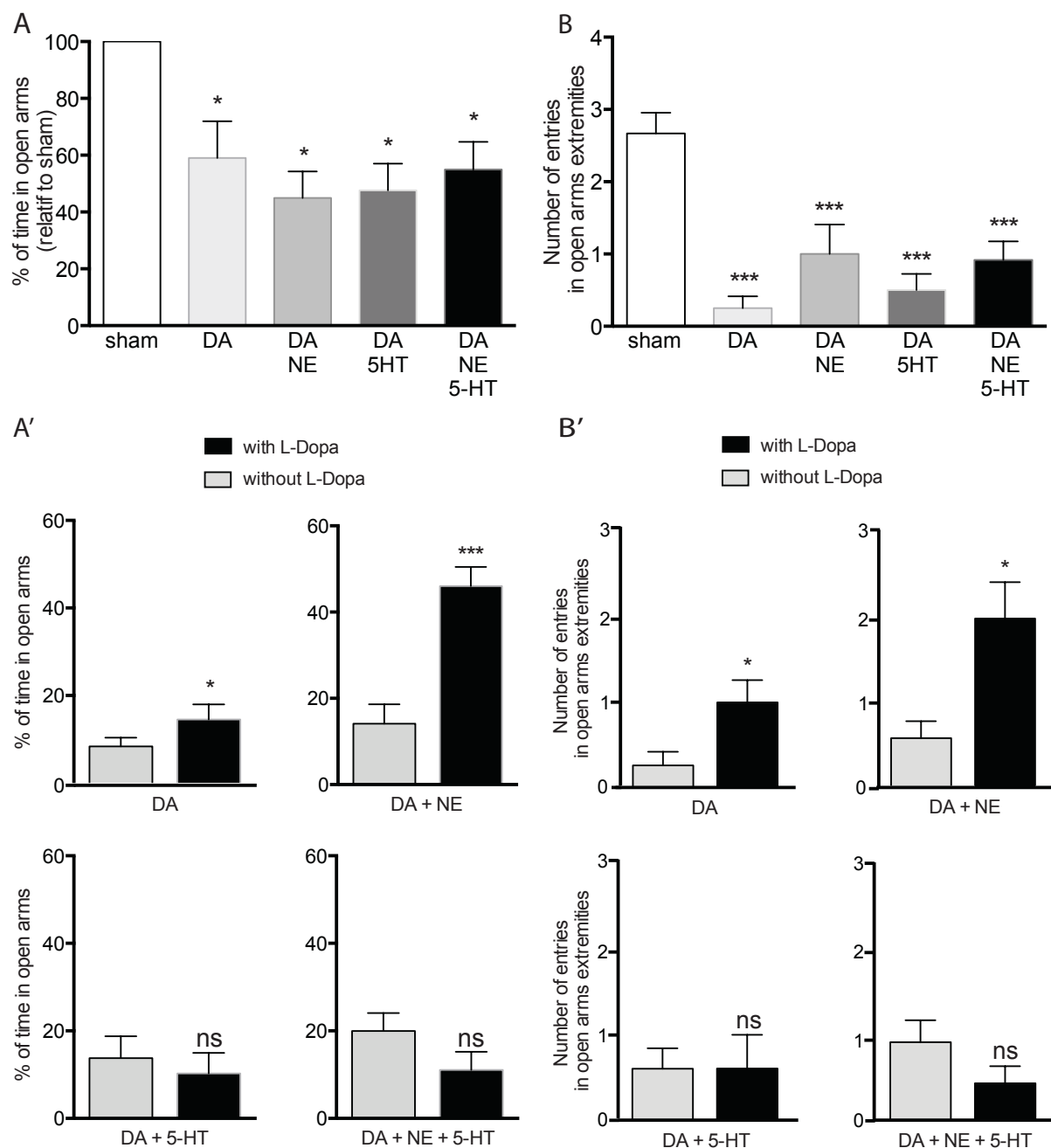


Figure 3 : Lesioning serotonin cells interferes with Levodopa-induced improvement of anxiety induced by lesion of monoaminergic systems Time spent and number of extremities, in open arms, in the elevated plus maze test. Histogram A shows the percentage of time spent into the open arms relative to the total time and relative to the score of sham rats (n=24), in DA-lesioned rats (n=8), DA and NE-lesioned rats (n=9), DA and 5-HT-lesioned rats (n=12) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=9). Histogram A' represents the effect of L-Dopa injection on the percentage of time spent into the open arms relative to the total time.

Histogram B represents the number of entries in open arms extremities in all the groups. Histogram B' represents the effect of L-Dopa on it. Values are the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham (A, B) and in comparison with basal lesioned without L-Dopa (A', B').

Effects of bilateral monoamine cell lesions on the firing activity of BLA neurons

Bilateral DA lesion alone or combined with NE and/or 5-HT tended to decrease the firing rate of BLA neurons but the differences were not significant (One-way Anova, $F=0,944$, $p=0,440$) (Fig. 5C). Moreover, the firing pattern was not affected by the bilateral monoamines lesions compared to sham-operated rats (χ^2 test, $X^2=3,95$, $df=8$, $p>0,05$) (Fig. 5D) as well as parameters related to burst analysis (results not shown).

Effects of L-Dopa on the firing activity of BLA neurons

L-Dopa significantly increased the firing rate of BLA neurons in rats with bilateral DA lesion alone and in rats with combined lesion of DA and NE (paired t-test, $p=0,029$ and $p=0,040$ respectively, Fig. 5A-B') to approach the basal level of sham rats ($p>0,05$). However, this L-Dopa-induced firing rate increase was lost in animals with an additional lesion of 5-HT. Indeed, L-Dopa did not significantly change the firing rate of BLA neurons in rats with combined lesions of DA and 5-HT or DA, NE and 5-HT ($p>0,05$) (Fig. 5C'). Concerning the firing pattern, L-Dopa treatment had no impact in all monoamine lesioned groups (χ^2 test, $X^2=0$, $df=1$, $p=1$ for each group) (Fig. 5D').

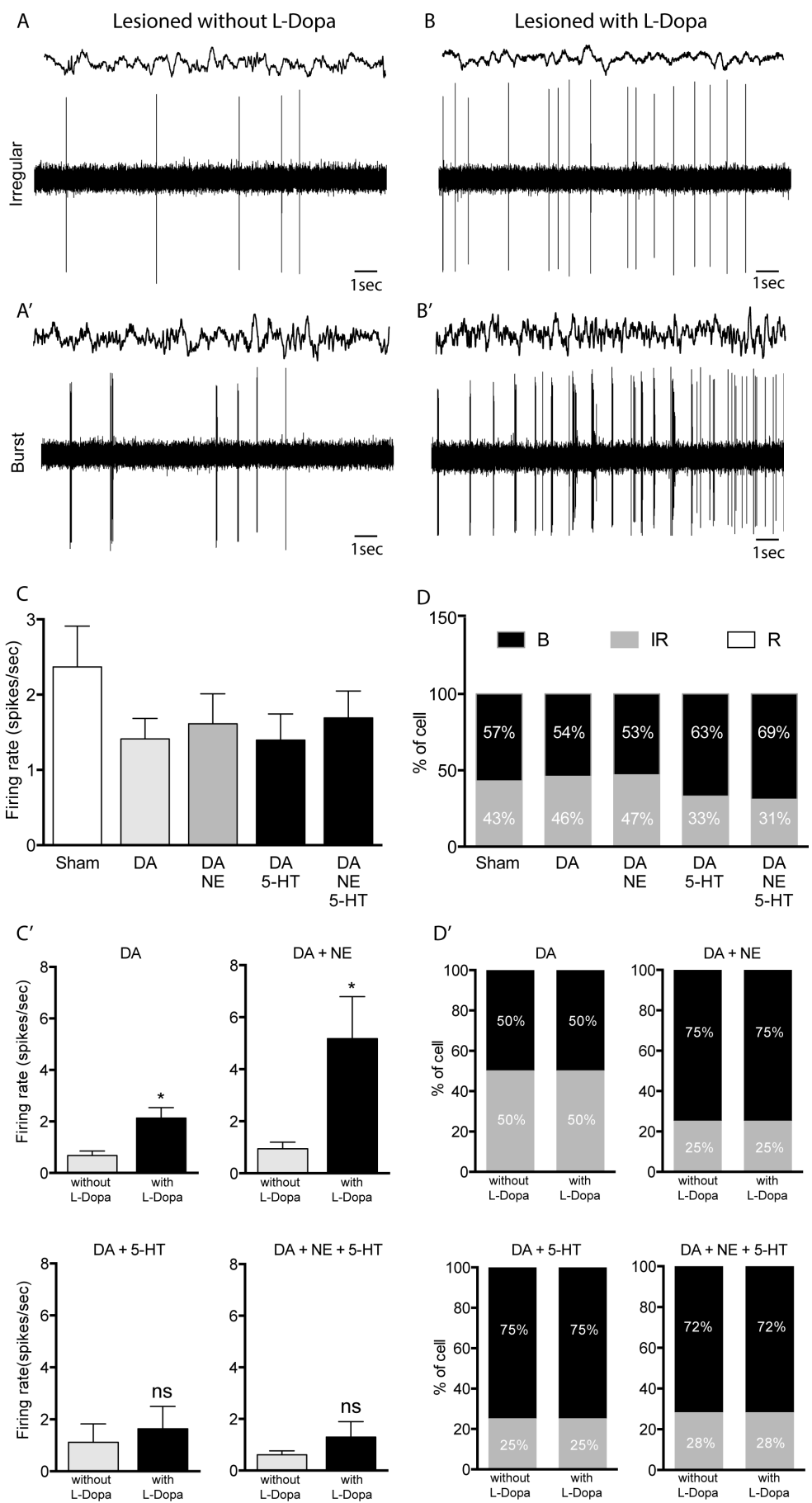


Figure 5 : Effect of monoaminergic lesions and of L-Dopa treatment on the spontaneous firing rate and pattern of discharge of BLA. A, A', B, B' represent section of recordings with representative examples of BLA neuronal activity and EEG associated before and after the injection of L-Dopa. C represents the mean \pm SEM of the firing rate (spikes/sec) of all BLA neurons recorded in each experimental group : sham rats (n=40), DA-lesioned rats (n=38), DA and NE-lesioned rats (n=34), DA and 5-HT-lesioned rats (n=27) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=49) and C' represents the effect of L-Dopa injection on the firing rate in each lesioned-group of rats : n=5 neurons in DA-lesioned rats and DA/5-HT-lesioned rats and n=6 neurons in DA/NE-lesioned rats and DA, NE and 5-HT-lesioned rats. Histogram D represents the firing pattern distribution of BLA neurons discharging in a regular (R, white portion), irregular (IR, grey portion) manner or with bursts (B, black portion) and D' the effect on L-Dopa on it. *: $p < 0.05$ in comparison with lesioned rats.

Discussion

Our results provide new insights into the pathophysiological mechanisms underlying the anxiety disorder reported in PD patients. Indeed, our data demonstrate that selective bilateral lesions of the SNc induced anxiety-like behavior, which was selectively reversed by L-dopa confirming the critical role played by DA SNc lesion in the manifestation of this non-motor behavioral deficit. Furthermore, we provide evidence for the link between anxiety and the changes in the neuronal activity of BLA. Finally, we show that the additional lesion of 5-HT did not potentiate the anxiogenic effect of DA lesion but play a role in the loss of efficacy of L-Dopa treatment on anxiety-like behavior, in parallel with the absence of changes in the electrical activity of BLA neurons.

The lesion procedures we used in our study caused selective and significant reductions in the number of TH-immunoreactive cells in the SNc and LC and fibers in the striatum. Moreover, the 5,7-DHT caused a reduction of 5-HT neurons in the DR nucleus. Despite the focus on DA cell loss in PD, it is now admitted that this pathology is a multi-system disorder characterized by other landmarks, such as the loss of NE and 5-HT neurons of the LC and DR respectively. Our animals with different combined bilateral monoamine lesions can be considered as models of severe advanced stage of PD. We used these models in order to study the impact of the different monoamine lesions on the potential efficacy of L-Dopa on anxiety. EPM test is a well validated and widely used paradigm to evaluate the relative anxiety-related status of rodents (Carobrez & Bertoglio, 2005). The paradigm is based on the conflict between the innate tendencies of the animals to explore novel environments versus their innate tendency to avoid open areas where the thigmotaxis is impossible, and to be afraid of heights (Bourin *et al.*, 2007; File, 2001). Our results showed that bilateral DA cell lesions induced anxiety-like behavior as it reduced the number of entries in the open arms extremities and time spent in these arms compared to sham rats. This anxiogenic-like effect has not been exacerbated by the additional depletions of NE and/or 5-HT. These results provide evidence that anxiety behaviour is a dopamine-dependent non-motor symptom in agreement with the suggestion of previous clinical studies in PD patients, (for review Chaudhuri & Schapira, 2009). Our results also showed that the bilateral nature of DA cell loss in the rat was necessary to induce anxiety-like behaviour in contrast to a previous study from our Lab., in which unilateral DA depletion alone was not sufficient to induce anxiety. This behavioural disorder was developed only when DA depletion was paralleled by noradrenergic and/or serotonergic depletion (Delaville *et al.*, 2012). However, our results are consistent with previous data, which showed that anxiety-related behavior in the rat, using the same EPM test, was seen after bilateral partial lesion of SNc DA neurons (Tadaiesky *et al.*, 2008; Drui *et al.*, 2014). Together, these

findings support the assumption that anxiety is not simply a consequence of motor impairment, but reflects a neuropathological, disease-related susceptibility.

To further investigate the role of DA and the impact of NE as well as 5-HT cell lesions, we tested whether L-Dopa treatment could reverse anxiety-like behavior. In parkinsonian patients, only few studies focused on the efficacy of L-Dopa on anxiety disorder, with conflicting results, (*for review* Eskow Jaunarajs *et al.*, 2011). While some studies have found significant improvement of anxiety under L-Dopa (Funkiewiez *et al.*, 2006; Stacy *et al.*, 2010), others showed no such benefit or that L-Dopa exacerbates anxiety disorder (Maricle *et al.*, 1995; Fetoni *et al.*, 1999). In our study, acute administration of L-Dopa significantly improved anxiety behavior in rats with bilateral DA cell lesions. This result is consistent with that of a previous study showing that anxiety-like behavior in the EPM, displayed by bilateral partial SNc-lesioned rats, was reversed by L-dopa and also by ropinirole, a D2/D3 dopamine receptor agonist (Drui *et al.*, 2014). Furthermore, we show that the same beneficial effect of L-Dopa was also observed in animals with additional NE LC lesions, but not in DA-lesioned rats with additional 5-HT cell lesions in the DR. These results support the assumption that in the context of PD advanced stage, the conversion of L-Dopa to DA takes place in 5-HT neurons, consistent with biochemical results, which showed that 5-HT neurons are at the origin of the diffuse increase in DA transmission induced by L-Dopa in 6-OHDA-lesioned rats (Navailles *et al.*, 2010a). Accordingly, in our study, the loss of 5-HT neurons in addition to the loss of DA cells compromised the conversion of L-Dopa to DA, resulting in the absence of efficacy of L-Dopa in improving anxiety. Altogether, our data suggest that in PD patients with no responses to L-Dopa treatment, 5-HT neurons may probably be affected by the natural course of the disease.

In order to better understand the pathophysiology of anxiety in the context of PD, we investigated whether the electrical activity of BLA neurons can be influenced by the monoaminergic system lesions and also by the administration of a therapeutic dose of L-Dopa. BLA has been reported to play a key role in anxiety and fear related behaviors (Lalumiere, 2014) and our results showed that DA cell lesion induced a tendency to decrease the firing rate of BLA neurons. This is consistent with the finding that bilateral partial DA lesion of the nigrostriatal pathway significantly decreased the firing rate of BLA neurons (Chen *et al.*, 2011). However, our results, as well as those of Chen and Colleagues, show that the depletion of DA did not influence the firing pattern of the same BLA neurons. Furthermore, like for anxiety behavior, the decrease in firing rate was not potentiated by the additional depletion of NE and/or 5-HT. These results are in line with the fact that BLA neurons receives dense dopaminergic innervation and express both D1 and D2 receptors (Scibilia *et al.*, 1992). Moreover, it has been shown a reduction of TH positive fiber densities in the BLA, lateral and central nucleus of the amygdala in 1-methy-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice (von Bohlen und Halbach *et al.*, 2005), and that the degeneration of dopaminergic neurons in the SNc produces a dramatic decrease in DA and its major metabolites in dopaminergic projection areas notably in BLA (Scatton *et al.*, 1983). Altogether, these results suggest that DA plays a role in the modulation of firing rate, but not the pattern of BLA neurons and that the degeneration of DA cells in the context of PD results in changes in the firing rate, at the origin of the manifestation of anxiety-like disorder. The fact that we found a tendency in the firing rate decrease in contrast to the significant decrease reported by Chen *et al.* (2011) can be explained by the differences in the lesioning methods and the anesthetics used. Indeed, we injected 6-OHDA into the MFB, and not into the striatum, to obtain a high level of DA cell loss in the SNc (>60%) compared to the partial bilateral lesion (30%) obtained by Chen and Colleagues (2011). Concerning the anesthetic, in

our study we used urethane, whereas Chen and Colleagues used chlorale hydrate, with the two anesthetics having different mechanisms and impact on neuronal activity (Li *et al.*, 2012).

We then investigated the effect of L-Dopa on the firing activity of BLA neurons. Our results showed that L-Dopa significantly increased the firing rate of BLA neurons in rats with bilateral DA depletion alone or combined with NE depletion to approach the basal level of sham rats. These changes paralleled the improvement of anxiety-like behavior induced by L-Dopa in animals with the same lesions. Our results are consistent with those of a previous study using imaging approaches based on the measure of blood oxygenation level (Tessitore *et al.*, 2002). Their data revealed a robust bilateral amygdala response to sensory information in normal controls that was absent in PD patients during the hypodopaminergic state. DA replacement partially restored this response in PD patients. However, and similar to the absence of changes in behavioral effects, L-Dopa did not change the firing rate of BLA neurons in rats with the additional lesion of 5-HT neurons. Like for anxiety behavior, here again we demonstrate that the loss of DA and 5-HT neurons compromised the efficacy of L-Dopa in normalizing the electrical activity of BLA neurons.

Our data provide *in vivo* evidence of the role of dopamine in modulating the firing rate of BLA neurons in the context of PD. We also show that DA replacement restored the abnormal response of the amygdala when the 5-HT neurotransmission is not affected. Furthermore, in the absence of 5-HT neurons, L-Dopa is not converted to DA and by the way compromised the responses of BLA neurons, and this phenomenon is responsible of the absence of efficacy of L-Dopa on anxiety behavior.

Bibliography

- Andrade, T.G., Macedo, C.E., Zangrossi, H., Jr. & Graeff, F.G. (2004) Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behavioural brain research*, **153**, 55-60.
- Asan, E., Steinke, M. & Lesch, K.P. (2013) Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety. *Histochemistry and cell biology*, **139**, 785-813.
- Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B. & Benazzouz, A. (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 9595-9606.
- Boraud, T., Bezard, E., Guehl, D., Bioulac, B. & Gross, C. (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain research*, **787**, 157-160.
- Bouali-Benazzouz, R., Tai, C.H., Chetrit, J. & Benazzouz, A. (2009) Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus. *Neuroscience*, **164**, 588-596.
- Bourin, M., Petit-Demouliere, B., Dhonnchadha, B.N. & Hascoet, M. (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, **21**, 567-574.
- Burbaud, P., Gross, C., Benazzouz, A., CousseMACq, M. & Bioulac, B. (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Experimental brain research*, **105**, 48-58.
- Carobrez, A.P. & Bertoglio, L.J. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **29**, 1193-1205.
- Chaudhuri, K.R. & Schapira, A.H. (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet. Neurology*, **8**, 464-474.
- Chen, L., Liu, J., Zhang, Q.J., Feng, J.J., Gui, Z.H., Ali, U., Wang, Y., Fan, L.L., Hou, C. & Wang, T. (2011) Alterations of emotion, cognition and firing activity of the basolateral nucleus of the amygdala after partial bilateral lesions of the nigrostriatal pathway in rats. *Brain research bulletin*, **85**, 329-338.
- Chetrit, J., Ballion, B., Laquitaine, S., Belujon, P., Morin, S., Taupignon, A., Bioulac, B., Gross, C.E. & Benazzouz, A. (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PloS one*, **4**, e6208.
- Cotzias, G.C. (1968) L-Dopa for Parkinsonism. *The New England journal of medicine*, **278**, 630.

- Delaville, C., Chetrit, J., Abdallah, K., Morin, S., Cardoit, L., De Deurwaerdere, P. & Benazzouz, A. (2012) Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiology of disease*, **45**, 763-773.
- Delaville, C., Deurwaerdere, P.D. & Benazzouz, A. (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Frontiers in systems neuroscience*, **5**, 31.
- Devos, D., Defebvre, L. & Bordet, R. (2010) Dopaminergic and non-dopaminergic pharmacological hypotheses for gait disorders in Parkinson's disease. *Fundamental & clinical pharmacology*, **24**, 407-421.
- Drui, G., Carnicella, S., Carcenac, C., Favier, M., Bertrand, A., Boulet, S. & Savasta, M. (2014) Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Molecular psychiatry*, **19**, 358-367.
- Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr*, **38**, 1236-1239.
- Eskow Jaunarajs, K.L., Angoa-Perez, M., Kuhn, D.M. & Bishop, C. (2011) Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of l-DOPA treatment. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **35**, 556-564.
- Eskow Jaunarajs, K.L., Dupre, K.B., Ostock, C.Y., Button, T., Deak, T. & Bishop, C. (2010) Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on nonmotor sequelae in the hemiparkinsonian rat. *Behavioural pharmacology*, **21**, 627-637.
- Fallon, J.H., Koziell, D.A. & Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *The Journal of comparative neurology*, **180**, 509-532.
- Fetoni, V., Soliveri, P., Monza, D., Testa, D. & Girotti, F. (1999) Affective symptoms in multiple system atrophy and Parkinson's disease: response to levodopa therapy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **66**, 541-544.
- File, S.E. (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural brain research*, **125**, 151-157.
- Funkiewiez, A., Ardouin, C., Cools, R., Krack, P., Fraix, V., Batir, A., Chabardes, S., Benabid, A.L., Robbins, T.W. & Pollak, P. (2006) Effects of levodopa and subthalamic nucleus stimulation on cognitive and affective functioning in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **21**, 1656-1662.

- German, D.C., Manaye, K.F., White, C.L., 3rd, Woodward, D.J., McIntire, D.D., Smith, W.K., Kalara, R.N. & Mann, D.M. (1992) Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Annals of neurology*, **32**, 667-676.
- Graeff, F.G. (2002) On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, **163**, 467-476.
- Guigoni, C., Li, Q., Aubert, I., Dovero, S., Bioulac, B.H., Bloch, B., Crossman, A.R., Gross, C.E. & Bezard, E. (2005) Involvement of sensorimotor, limbic, and associative basal ganglia domains in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 2102-2107.
- Kaneoke, Y. & Vitek, J.L. (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *Journal of neuroscience methods*, **68**, 211-223.
- Kish, S.J. (2003) Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Advances in neurology*, **91**, 39-49.
- Labarre D, Meissner W, Boraud T (2008) Measure of the regularity of events in stochastic point processes, application to neuron activity analysis. In: 33rd IEEE International Conference on Acoustics, pp 489-492. Las Vegas, NV.
- Lalumiere, R.T. (2014) Optogenetic dissection of amygdala functioning. *Frontiers in behavioral neuroscience*, **8**, 107.
- Li, Y., Du, X.F., Liu, C.S., Wen, Z.L. & Du, J.L. (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental cell*, **23**, 1189-1202.
- Maricle, R.A., Nutt, J.G., Valentine, R.J. & Carter, J.H. (1995) Dose-response relationship of levodopa with mood and anxiety in fluctuating Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*, **45**, 1757-1760.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C. & De Deurwaerdere, P. (2010a) Chronic L-DOPA therapy alters central serotonergic function and L-DOPA-induced dopamine release in a region-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **41**, 585-590.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C. & De Deurwaerdere, P. (2010b) Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **38**, 136-143.
- Ni, Z.G., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D.M., Benabid, A.L. & Benazzouz, A. (2001) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain research*, **899**, 142-147.

- Pare, D. & Gaudreau, H. (1996) Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 3334-3350.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1996) The Rat Brain in Stereotatic Coordinates. *Academic Press, San Diego*.
- Scatton, B., Javoy-Agid, F., Rouquier, L., Dubois, B. & Agid, Y. (1983) Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain research*, **275**, 321-328.
- Scibilia, R.J., Lachowicz, J.E. & Kilts, C.D. (1992) Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse*, **11**, 146-154.
- Stacy, M.A., Murck, H. & Kroenke, K. (2010) Responsiveness of motor and nonmotor symptoms of Parkinson disease to dopaminergic therapy. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **34**, 57-61.
- Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C. & Takahashi, R.N. (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **156**, 830-840.
- Tai, C.H., Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B., Gross, C. & Benazzouz, A. (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**, 1820-1830.
- Tessitore, A., Hariri, A.R., Fera, F., Smith, W.G., Chase, T.N., Hyde, T.M., Weinberger, D.R. & Mattay, V.S. (2002) Dopamine modulates the response of the human amygdala: a study in Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 9099-9103.
- von Bohlen und Halbach, O., Schober, A., Hertel, R. & Unsicker, K. (2005) MPTP treatment impairs tyrosine hydroxylase immunopositive fibers not only in the striatum, but also in the amygdala. *Neuro-degenerative diseases*, **2**, 44-48.
- Yahr, M.D., Duvoisin, R.C., Shear, M.J., Barrett, R.E. & Hoehn, M.M. (1969) Treatment of parkinsonism with levodopa. *Archives of neurology*, **21**, 343-354.
- Zarow, C., Lyness, S.A., Mortimer, J.A. & Chui, H.C. (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Archives of neurology*, **60**, 337-341.

Article 4

Faggiani et al., 2014
En préparation

**Les troubles dépressifs et l'apathie ont des origines
différentes dans la maladie de Parkinson**

Résumé :

La maladie de Parkinson est caractérisée par la manifestation de symptômes moteurs principalement dus à la dégénérescence du système dopaminergique. Malgré l'accent mis sur les déficits moteurs, la maladie de Parkinson est également caractérisée par la manifestation des symptômes non moteurs qui sont mal étudiés et ne sont donc pas bien traités. En effet, les troubles de l'humeur, associés au noyau latéral de l'habénula impliqué dans le contrôle des comportements de motivation, sont retrouvés chez plus de 35% des patients. La dysfonction des systèmes non-dopaminergiques comme le système noradrénergique et sérotoninergique contribueraient au développement de l'apathie et de la dépression observées chez les patients parkinsoniens. Ici, nous avons étudié le rôle respectif de la dopamine, de la noradrénaline et de la sérotonine dans la manifestation du comportement dit dépressif, de l'anhédonie et de l'apathie chez le rat ; Ensuite, nous avons voulu savoir si ces lésions monoaminergiques pouvaient interférer avec l'effet de la Lévodopa sur les troubles de l'humeur ; Enfin, nous avons étudié le rôle du noyau latéral de l'habenula dans les effets observés. Nous avons induit la lésion sélective des trois systèmes monoaminergiques et nous avons montré que la lésion bilatérale des neurones dopaminergiques seuls induit un comportement dit dépressif ainsi que l'anhédonie qui ne sont pas potentialisés par les lésions additionnelles des neurones noradrénergiques ou sérotoninergiques. Nous avons également montré que l'ajout de la lésion bilatérale des neurones sérotoninergiques du raphé dorsal est à l'origine d'un manque de motivation similaire à l'apathie rapportée chez les patients parkinsoniens. La Lévodopa a nettement inversé le comportement dépressif chez les animaux présentant une lésion bilatérale dopaminergique seule ou associée aux lésions noradrénergique et sérotoninergique. Toutefois, la L-Dopa n'a eu aucun effet sur l'anhédonie et l'apathie. Nous avons également montré le lien qui existe entre la dépression et l'activité neuronale de l'habénula latérale. En effet, le

traitement à la Lévodopa augmente la réponse des neurones de l'habénula en parallèle avec son efficacité sur le comportement dit dépressif.

Nos données mettent en évidence le rôle de la dopamine dans la modulation de l'activité neuronale de l'habénula latérale dans le contexte de la maladie de Parkinson car la restauration de DA par la Lévodopa augmente sa fréquence ce qui illustre l'efficacité du traitement sur le comportement « dit-dépressif ». Ceci met en lumière le rôle important joué par la lésion des neurones dopaminergiques dans la manifestation du trouble dépressif traité par la Lévodopa. Elles fournissent la preuve que l'apathie, insensible à la Lévodopa, ne dépend pas uniquement de la lésion dopaminergique mais met également en jeu le système sérotoninergique.

Depression and apathy disorders have different origins in Parkinson's disease

Emilie Faggiani^{1,2}, Mark Janssen³, Frederic Naudet^{1,2}, Yasin Temel³, Abdelhamid Benazzouz^{1,2,*}

1. Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33076 Bordeaux, France.
2. CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33076 Bordeaux, France.
3. Department of Neuroscience and Neurosurgery, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands.

* To whom correspondence should be addressed: Abdelhamid Benazzouz, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université de Bordeaux, Campus de Carreire, Bât 3B 1er étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex

Phone : +33 05 57 57 46 25. E-mail : abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux.fr

Abstract

Despite the focus on motor deficits, Parkinson's disease is also characterized by non-motor symptoms, including mood disorders, mediated by lateral habenula (LHb), which is understudied and therefore are not well treated. Here, we first investigated the respective role of dopamine (DA), norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) in the manifestation of depressive like behavior, anhedonia and apathy; second, whether these monoaminergic lesions can interfere with the effect of L-Dopa on mood disorders ; and finally, the role played by LHb in the observed effects. We induced selective lesion of monoamines and we showed that bilateral DA cell lesion alone induced depressive-like behavior and anhedonia and that additional depletions of NE and/or 5-HT did not potentiate this effect. We also showed that additional selective bilateral lesions of 5-HT neurons in the dorsal raphe induced a lack of motivation similar to the apathy reported in PD patients. L-Dopa reversed depressive-like behavior in rats with bilateral DA cell lesion alone or combined with the NE and/or 5-HT depletion. However, L-Dopa had no effect on anhedonia and apathy. We also showed a link between depressive like behavior and the neuronal activity of LHb as L-Dopa treatment increased the response of LHb neurons in parallel with the efficacy of L-Dopa on depressive-like behavior. Our data highlight the important role of DA in modulating the firing rate of LHb and the DA cell degeneration at the origin of the manifestation of depressive-like disorder. Moreover, we provide the first evidence that apathy, insensitive to the replacement of DA by L-Dopa, is not dependent solely to DA depletion but to the combination of DA and 5-HT cell degeneration.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of dopamine (DA) neurons in the *pars compacta* of substantia nigra (SNc) (Ehringer & Hornykiewicz, 1960) at the origin of the cardinal motor symptoms. However, neuropathological and biochemical studies reported the occurrence of significant concomitant degeneration in non-dopaminergic pathways, including norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) containing neurons in the locus coeruleus (German *et al.*, 1992) and the dorsal raphe (Kish, 2003). Dysfunction of these monoaminergic systems have been suggested to contribute to the development of apathy and depression observed in PD (Politis & Niccolini, 2014), (Zarow *et al.*, 2003). They are often unrecognized and consequently undertreated contributing to a decline in the quality of life (Uekermann *et al.*, 2003).

By using the unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of PD, Delaville and Colleagues (Delaville *et al.*, 2012) provided evidence for the manifestation of mood-like behavioral disabilities when NE and 5-HT depletions were combined with DA depletion, suggesting that PD should be modeled as a monoaminergic pathology. However, in this study DA cell lesion was carried out only unilaterally, not bilaterally, and that NE and 5-HT cells have not been lesioned. Indeed, NE depletion was induced by i.p. injection of DSP-4, a neurotoxin selective for the degeneration of NAergic fibers arising from the LC but not cell bodies, and 5-HT depletion was carried out by pCPA, a selective inhibitor of tryptophan hydroxylase (Delaville *et al.*, 2012). In the present study we extended this work by using the bilateral 6-OHDA rat model in which nigral DA lesion was combined with bilateral NE and/or 5-HT cell lesioning in the LC and DR respectively.

Levodopa (L-Dopa) successfully improves the cardinal motor symptoms in PD patients for several years by restoring dopaminergic neurotransmission (Cotzias, 1968; Yahr *et al.*, 1969),

However, conflicting data have been reported on mood disorders (Thobois *et al.*, 2010; Fleury *et al.*, 2014). Furthermore, long-term treatment with L-DOPA has been shown to induce the emergence of debilitating motor, cognitive and limbic side effects (Storch *et al.*, 2013). The effects of L-Dopa have been attributed to pre- and post-synaptic changes in DA neurotransmission at striatal and extrastriatal levels leading to aberrant signaling in the sensorimotor, cognitive and limbic brain structures (Cenci & Lundblad, 2006; Guigoni *et al.*, 2005; Bastide *et al.*, 2014). However, the impact of NEergic and 5-HTergic cell lesions on the effect of L-Dopa on mood disorders is still unclear. Furthermore, anatomo-functional and electrophysiological studies unravelled that the lateral habenula (LHb), which is involved in motivational control of behavior, plays a role in the mechanism of action of L-Dopa (Guigoni *et al.*, 2005). Based on its prominent relationship with the monoaminergic systems, the LHb acts as a central relay nucleus to form a complex and coordinated network for the regulation of important motor behaviors and for processing of emotion and motivation-encoded information (Hikosaka, 2010; Klemm, 2004; Geisler & Trimble, 2008; Bianco & Wilson, 2009). However, the link between mood disorder, monoaminergic cell lesions and the neuronal activity of LHb and their interaction with L-Dopa treatment is not established.

The present study aimed to investigate, first, the respective role of combined bilateral lesions of the DA, NE and 5-HT neurons on depressive-like behaviour, anhedonia and apathy; second, whether these monoaminergic lesions can interfere with the effect of L-Dopa on mood disorders; and finally, the role played by LHb in the observed effects.

Materials and Methods

Animals

Adult male Sprague-dawley rats, weighing 280 g at the beginning of the experiments were used for experiments. They were housed four per cage under artificial conditions of light (light/dark cycle, light on at 7:00 a.m.), temperature (24°C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All animal experiments were carried out in strict accordance with the Council Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol was approved by the local Committee on the Ethics of Animal Experiments “Comité d’éthique pour l’expérimentation animale Bordeaux” (Permit Numbers: 50120126-A and 50120136-A).

Drugs

6-hydroxydopamine (6-OHDA), ascorbic acid, desipramine, 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT), L-Dopa methylester-hydrochloride, benserazide-hydrochloride, and all anesthesia drug were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Animal groups

After exclusion of unlesioned animals, the rats were divided into the following five experimental groups: a DA-lesioned group (n=9); a DA and NE-lesioned group (n=8); a DA and 5-HT-lesioned (n=10); a DA, NE and 5HT-lesioned (n=10) and four sham groups with 6 rats for each of them associated with each lesioned group (n=6x4).

Surgical procedure

In brief, one hour before surgery rats were injected with Temgesic (0.1 mg/kg, s.c.) for analgesia and rats from group without NE cell lesion were injected with desipramine (25

mg/kg, i.p.) to protect NE neurons from 6-OHDA toxicity. Throughout surgery, rats were anaesthetized using ketamine/xylazine (ketamine hydrochloride 75 mg/kg, i.p. and xylazine hydrochloride, 10 mg/kg, i.p.). Once anaesthesia was induced, the rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, France); the skull was exposed, and burr holes were made. The vehicle or toxins were slowly injected bilaterally in the median forebrain bundle (MFB) at the following coordinates relative to Bregma (in mm): AP: 2,8 ML: +/- 2, DV -8,4) (Paxinos & Watson, 1996). Vehicle was injected bilaterally in the MFB of sham animals (0.2% ascorbic acid dissolved in 0.9% saline), or 6-OHDA (3,3 μ g dissolved in 2 μ l of 0.9% saline, Sigma) in DA lesioned animals and in addition 5,7-DHT (3 μ l in each mfb or 4 μ g/ μ l; Sigma) in groups with the 5-HT cell lesion. At the end of each injection, the cannula remained at the injection position for an additional 5 min and was then slowly withdrawn from the brain. After surgery, the rats were returned to the animal facility with food and water available ad libitum, and in addition, they were nursed *and* fed with additional cereals, apple and formula milk during three days. After surgery, the rats were given a 3-weeks recovery period before behavioural assessment was started.

Treatment protocol

L-Dopa at therapeutical dose (12 mg/kg) was administrated 40 minutes before tests (best effect of L-Dopa, (Navailles *et al.*, 2010b). L-Dopa was dissolved in sterile NaCl 0.9 % preceded by 15 mg/kg benserazide to prevent its peripheral decarboxylation.

All the following behavioral tests were performed before and after i.p. injection of L-Dopa

Evaluation of “mood disabilities”

Evaluation of “depressive-like behavior” in the forced swim test (FST)

The FST is a widely and validated test used in animal models of depression (Temel *et al.*, 2007); (Delaville *et al.*, 2012). Testing was carried out by using a transparent Perspex cylinder (50 x 20 cm) filled with tap water (25±1°C) to a depth of 30 cm. In a pretest session, each rat was placed in the water for 15 min. The following day, rats were placed in the water for 5 min. Recordings of behavior were taken by a digital camera placed above the cylinder. The duration of immobility was determined offline, and a rat was judged to be immobile when he remained floating in the water without struggling and was making only those movements necessary to maintain the nose above water.

Sucrose preference

Anhedonia was investigated using the sucrose preference test (Ackroff & Sclafani, 2003). Rats were placed in individual cages with food and water ad libitum. Over the course of three days, rats were housed in the presence of two bottles of water and the position of the water bottles was randomly changed. When the lights went out at 7:00 p.m., pre-weighed water and 1% sucrose bottles were placed on the home cage and rats were allowed to drink for 2 h. During these 2 h the position of the bottles was changed. The 2 h intake was measured by weighing the bottles before and after the test. Sucrose preference was calculated as follow:

$$PS=100\times[\text{sucrose intake (g)}/(\text{sucrose intake (g)}+\text{water intake (g)})].$$

Skinnerbox

Apparatus

Rats were trained and tested in 10 identical Skinner boxes (30,5 cm30.5 cm x 24.1 cm x 29.2) (Med Associates, St. Albans, USA). The ceiling of these conditioning chambers contained a light that illuminated the conditioning chamber during experiments. The left and right

sidewalls served as control panels. A recess built into the center of the right side panel contained a food tray into which a pellet dispenser delivered 45-mg food pellets (AIN-76A, TestDiet, Richmond, USA). Two 4,8 cm wide retractable stainless steel levers are situated 2,1 cm above the floor and projected 1,9 cm onto the conditioning chamber on both sides of the food tray. Above each lever a light was situated to give a visual stimulus. An audio stimulus could be given. The conditioning chambers were enclosed in sound-attenuating housing. Background noise was produced by a radio and an exhaust fan. A personal computer controlled the experimental equipment and collected the data.

Progressive ratio (ten) task

Training of animals: Before and after surgery rats first underwent magazine training sessions and were then subjected to continuous reinforcement (CRF). Next the rats were trained on a fixed ratio schedule of reinforcement, in which they had to press a lever for five times (FR5) in order to obtain a 45-mg food reward (Klinkenberg & Blokland, 2011). Reinforcement was continuous; each set of five lever presses was rewarded. A session was terminated after 60 trials or 30 min. Rats were trained everyday (including weekends) and data was collected when the last 3 sessions were stable over time. The baseline measures used to evaluate performance on the FR5 schedule were averaged for each animal over the last three sessions.

After training: After finishing the FR5 task, rats immediately started training on a progressive ratio (PR10) schedule of reinforcement (Hodos, 1961). PR tasks are generally used to assess the reinforcing efficacy of a particular type of reward which permit to study the motivation. The rats had to progressively increase the response requirement (steps of ten lever presses) to obtain a food reward. For the first food pellet, they were required to press ten times, for the next reinforcement they had to press the lever twenty times, and so on. A session was terminated if a rat did not press the lever for 2 min. Rats were trained every day (including

weekends) and data was collected when the last 3 sessions were stable over time. The measure used to evaluate performance in the PR10 task was breakpoint (number of lever presses made during a session).

Extracellular single-unit recordings

Extracellular single-unit recordings in the LHb were performed in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg i.p.) as previously reported (Ni *et al.*, 2001). A single glass micropipette electrode (impedance: 8–12 MΩ; aperture 0.5 μm) was filled with 4% Pontamine Sky Blue in 3 M NaCl and then lowered into the LHb according to the following stereotaxic coordinates (in mm: AP: -3,4mm ; L : -1 mm ; P : 4,2 – 5 mm, (Paxinos & Watson, 1996). LHb neurons were recorded in each rat and were identified according to their firing activity as previously reported (Kowski *et al.*, 2009); (Zhao *et al.*, 2014). Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass filtered (300–3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK), and transferred via a Powerlab interface (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio >3:1 was recorded and used for further investigation. Basal firing of neurons was recorded for 20 min to ascertain the stability of the discharge activity. At the end of each recording session, L-Dopa was injected intraperitoneally and the recorded LHb neuron was followed during 2 hours after the injection. Then, the recording site was marked by an electrophoretic injection (Iso DAM 80, WPI, Hertfordshire, UK) of Pontamine Sky Blue through the micropipette at a negative current of 20 μA for 7 min. The location of the Pontamine Sky Blue dots was histologically verified as previously reported (Belujon *et al.*, 2007); (Ni *et al.*, 2001) and only brains with clear blue dots in the BLA were used for data analysis. A reconstruction of each recording site for each trajectory under microscope was carried out to consider only neurons recorded in the target structure.

Data analysis. The electrical activity of each neuron was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instruments), and firing parameters (interspike interval: 5-ms bin) were calculated using Neuroexplorer program (Alpha Omega, Nazareth, Israel). Firing rates were expressed as the averaged frequency of discharge calculated over the 20-min period of stabilization, and the value for each group is the mean \pm SEM. Firing patterns were analyzed as previously described (Labarre *et al.*, 2008). Three patterns were determined: a regular pattern, with a discharge density distribution of spike train that follows a near-normal distribution; an irregular pattern, which follows a Poisson distribution; and a bursty pattern, with a discharge density histogram that follows two different distributions (Kaneoke & Vitek, 1996). The number of cells discharging in each pattern was expressed as a percentage of the total number of the recorded neurons.

Validation of the recording site

After completion of the experiments, animals were sacrificed by intracardiac perfusion of 4% paraformaldehyde, the brains removed, frozen in isopentane at -45°C and stored at -80°C . Perfused brains were cryostat-cut into 20 μm coronal sections and acetylcholine esterase staining was used as previously described (Chetrit *et al.*, 2009) to determine the location of the Pontamine sky blue dots. Only brains in which the recording was shown to be in the BLA were used for data analysis.

Validation of DA, NE and 5-HT cell lesions

DA cell loss in the SNc, DA fibers loss in the striatum and NE cell loss in the LC were verified by immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase (TH) as previously described (Bouali-Benazzouz *et al.*, 2009). Sections of the SNc, striatum and LC were immuno-stained and only rats with a significant loss of TH immunoreactivity were used to analyze behavioral and electrophysiological data.

5-HT cell loss in the DRN was verified by immunohistochemistry of 5-HT in the DRN. Sections containing the DRN were incubated for one night with a rabbit anti-5-HT antibody (1:50). The remaining steps including the secondary antibody, ABC-step, the visualization of the horseradish peroxide reaction product and only rats with a significant loss of 5-HT immunoreactivity were used to analyze behavioral and electrophysiological data.

The number of TH-immunoreactivity or 5-HT-immunoreactivity cells were obtained applying the optical fractionator (9, 34, 46, 47) unbiased stereological method using a Leica DM6000B microscope with Mercator Pro software (ExploraNova, version 7.9.8). Immunolabelled cells were counted by a blinded investigator on every 6th section for the SN and the DR and on every 3th section for the LC previously used with stereological parameters adapted to SN (Counting frames: 80×80 µm, Spacing: 240×180 µm, number of sections: 5), to DR (Counting frames: 60×60 µm, Spacing: 80×120 µm, number of sections: 4) or to LC (Counting frames: 60×60 µm, Spacing: 80×100 µm, number of sections: 3).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Sigmaplot (Systat Software, San Jose, USA). For behavioral and immunohistochemical data, values between sham-operated and each depleted-group were compared using a One-way Anova test. When normality test passed, we used a One-way Anova test followed, when significant, by a student Newman-Keuls multiple post-tests. When normality test failed, we used a Kruskal-Wallis test, when significant, followed by a post-hoc Dunn's method. The effect of L-Dopa in each depleted group, before and after drug injection, was compared using a Wilcoxon paired t-test. For electrophysiological data, firing rates between all the groups were compared using a one-way Anova test. The effect of L-Dopa in depleted rats, before and after drug injection, was compared using a paired t-test. Firing patterns were analyzed using the method developed by (Kaneoke & Vitek, 1996) as previously described (Boraud *et al.*, 1998) to determine if LHB

neurons discharged with regular, irregular or bursty pattern and the proportions of neurons according to their pattern were compared using a Chi² test.

Results

Validation of DA, NE and 5-HT lesions

Bilateral 6-OHDA injection into the MFB induced DA loss in the SNc as revealed by the decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity (TH-IR) (One-way ANOVA, $F=88.815$, $p<0,001$). Indeed, TH-IR decreased in the SNc of the four lesioned rats by 66% in DA-lesioned rats ($p<0,001$), by 71% in DA/NE-lesioned rats ($p<0,001$), by 70% in DA/5-HT-lesioned rats ($p<0,001$) and by 77% in DA/NE/5-HT-lesioned rats ($p<0,001$) (Fig. 1A). Likewise, bilateral 6-OHDA injection into the MFB induced DA denervation throughout the striatum as revealed by the decrease in TH-IR (Kruskal-Wallis, $F=46.684$, $p<0,001$). Indeed, the TH-IR decreased by 75% in DA-lesioned rats ($p<0,001$), by 72% in DA/NE-lesioned rats ($p<0,001$), by 71% in DA/5-HT-lesioned rats ($p<0,001$) and by 86% in DA/NE/5-HT-lesioned rats ($p<0,001$) (Fig. 1B and Fig. 2A-A').

Bilateral 6-OHDA injection into the MFB, without prior desipramine treatment, induced NE cell loss in the LC. Indeed, compared to sham rats, TH-IR cells decreased by 59% in DA/NE-lesioned rats and by 56% in DA/NE/5-HT-lesioned rats (One-way ANOVA, $F=51.459$, $p<0,001$; $p<0,001$ and $p<0,001$ respectively). (Fig. 1C and Fig. 2D-F'). However, TH-IR cells in the LC of the other groups were not affected ($p>0,05$).

Bilateral 5,7-DHT injection into the MFB induced specific loss of 5-HT neurons in the DR. Indeed, 5-HT-immunoreactive (5-HT-IR) cells in the DR decreased by 75% in DA/5-HT-lesioned rats and by 66% in DA/NE/5-HT-lesioned rats (One-way ANOVA, $F=17.67$, $p<0,001$, $p<0,001$ and $p<0,001$ respectively, Fig. 1D and Fig. 2G-I').

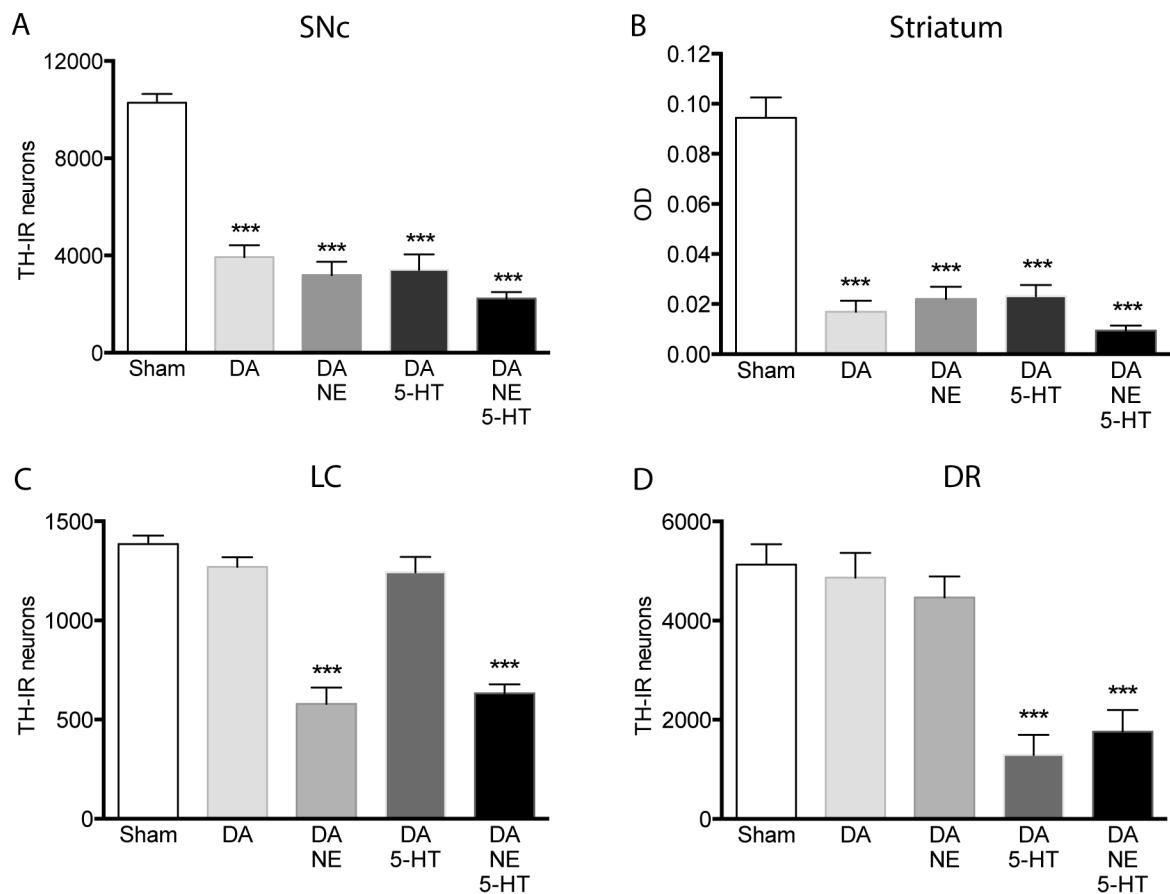


Figure 1: Treatment induced selective lesion of DA, NE and 5-HT cells. Quantification of the loss of TH staining in the SNc (A), the striatum (B), the LC (C) and the DR (D). Histograms A, C and D represent the TH-immunoreactivity loss compared to sham rats (n=24), DA-lesioned rats (n=9), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5-HT-lesioned rats (n=10) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=10). Histogram B represents the optical density in all groups. Values are the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham (A, B, C) and with basal lesioned rats without L-Dopa (A', B', C'). SNc : substantia nigra *pars compacta* ; LC : locus coeruleus ; DR : dorsal raphe.

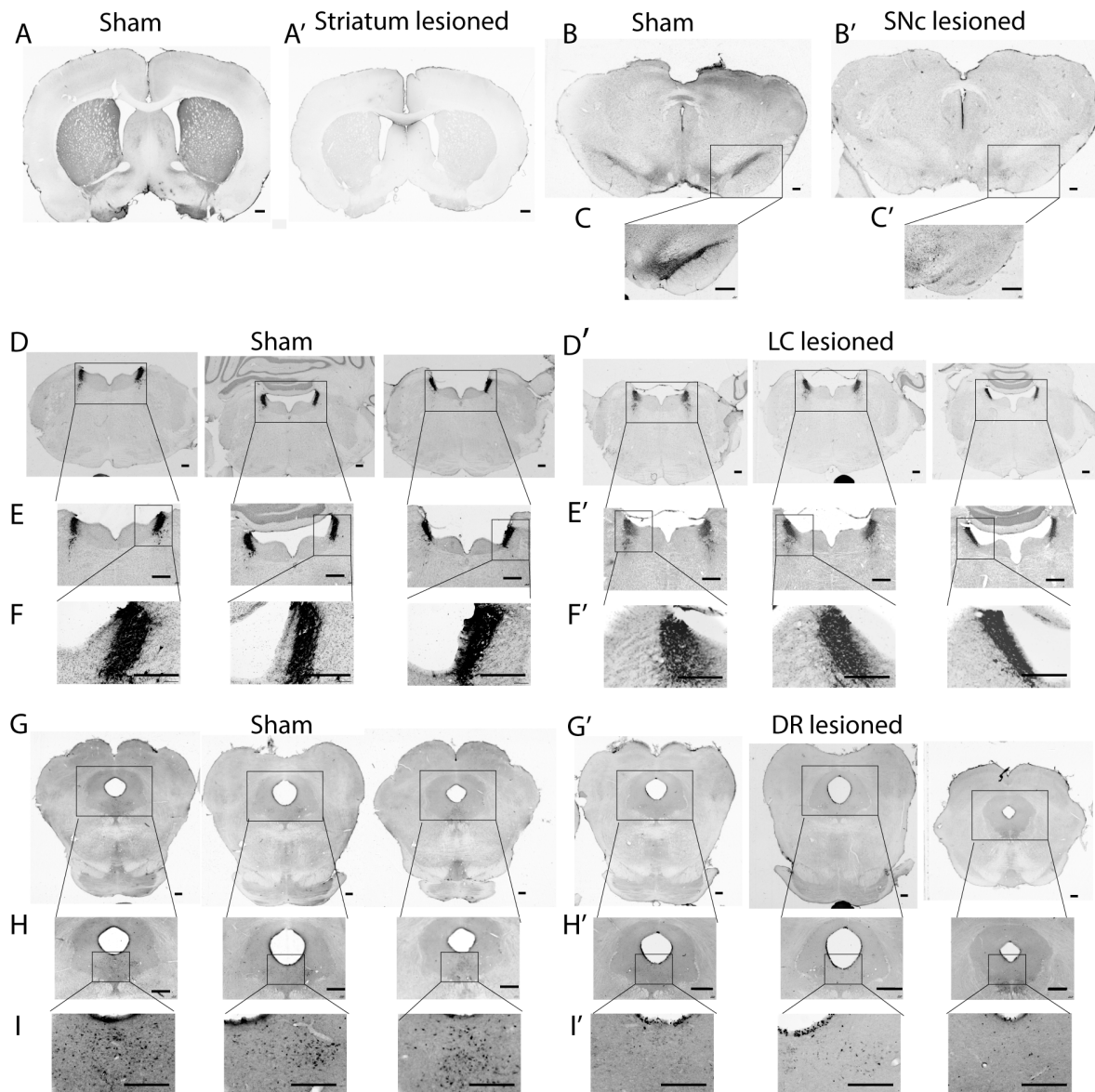


Figure 2 : Treatment induced selective lesion of DA, NE and 5-HT cells. Validation of the lesion model by tyrosine hydroxylase (TH) stained on coronal sections of striatum in sham rat (A) and lesioned rat (A'), of SNc in sham rat (B and C: zoom 2.5) and lesioned rat (B' and C'), of LC in sham rat (D, E : zoom 2.5 and F : zoom 10) and lesioned rat (D', E', F') and of DR in sham rat (G, H : zoom 2.5 and I : zoom 10) and lesioned rat (G', H' and I'). Scale bar : 1mm. For zoom 10, scale bar : 0,1 mm. SNc : substantia nigra *pars compacta* ; LC : locus coeruleus ; DR : dorsal raphe.

Effects of bilateral monoamine depletions on depression-like behavior (FST)

Bilateral DA depletion alone or combined with NE and/or 5-HT significantly affected the immobility time in the FST (One-way ANOVA, $F=13.603$, $p<0.001$; Fig. 2A). Indeed, bilateral DA depletion alone significantly increased the immobility time by 209% compared to sham animals ($p<0.001$). Interestingly, Additional NE and/or 5-HT depletions did not induce any potentiation of the depressive-like behavior induced by DA depletion as the percentage increase was 270% in rats with combined depletions of DA and NE, 193% in rats with combined depletions of DA and 5-HT and 187% in rats with combined depletions of the three monoamines ($p>0.05$ compared to DA-depleted animals; $p<0.001$, $p=0.008$ and $p<0.001$ respectively compared to sham rats).

Effects of bilateral monoamine depletions on anhedonia (Sucrose preference test)

Bilateral depletion of DA alone or combined with that of NE and/or 5-HT significantly affected the sucrose consumption compared to sham-operated rats (One-way ANOVA, $F=9.48$, $p<0.001$; Fig. 1B). Indeed, bilateral DA depletion alone significantly decreased the sucrose consumption by 34% compared to sham rats ($p<0.001$). Here again, additional NE and/or 5-HT depletions did not induce any potentiation of the anhedonia induced by DA depletion ($p>0.05$ compared to DA-depleted animals) as the percentage decrease of the score of sucrose consumption was of 35% in rats with combined depletions of DA and NE, 25% in rats with combined depletions of DA and 5-HT and 20% in rats with combined depletions of the three monoamines ($p=0.001$, $p=0.017$, and $p=0.020$ respectively compared to sham rats).

Effects of bilateral monoamine depletions on motivation (PR in Skinner box)

Bilateral DA depletion alone or combined with the NE depletion did not affect the number of presses during the progressive ratio task ($p>0.05$). However, interestingly, bilateral DA depletion combined with 5-HT alone or with 5-HT and NE together significantly affected the

motivation (One-way ANOVA, $F=5.44$ $p=0.001$; Fig. 1C). Indeed, additional 5-HT depletion to that of DA depletion significantly decreased the number of presses during the progressive ratio task (by 72%, ($p=0.002$) for DA/ and 5-HT-depleted lesioned rats and by 51% ($p=0.037$) for DA/NE/5-HT-lesioned depleted rats compared to sham-operated rats).

Effects of L-Dopa on mood disorders induced by combined lesions of the monoaminergic systems

L-Dopa (12mg/kg) improved the “depressive like behavior” in the rats of all the groups with monoamines depletions, as it decreased the time of immobility in the FST (Wilcoxon paired t-test, $p=0.001$ for DA-lesioned rats, $p=0.008$ for DA/NE-lesioned rats, $p=0.010$ for DA/5-HT-lesioned rats and $p<0.001$ for DA/NE/5-HT-lesioned rats compared to each of the corresponding lesioned group without L-Dopa treatment, Fig. 2A’). L-Dopa was able to return the immobility time to a normal baseline level in the rats of all the lesioned groups ($p>0.05$ compared to sham-operated rats). However, this pharmacological treatment did not improve anhedonia in the sucrose preference test ($p>0.05$, Fig. 2B’) nor the motivation in the progressive ratio of the skinner box ($p>0.05$, Fig. 2C’).

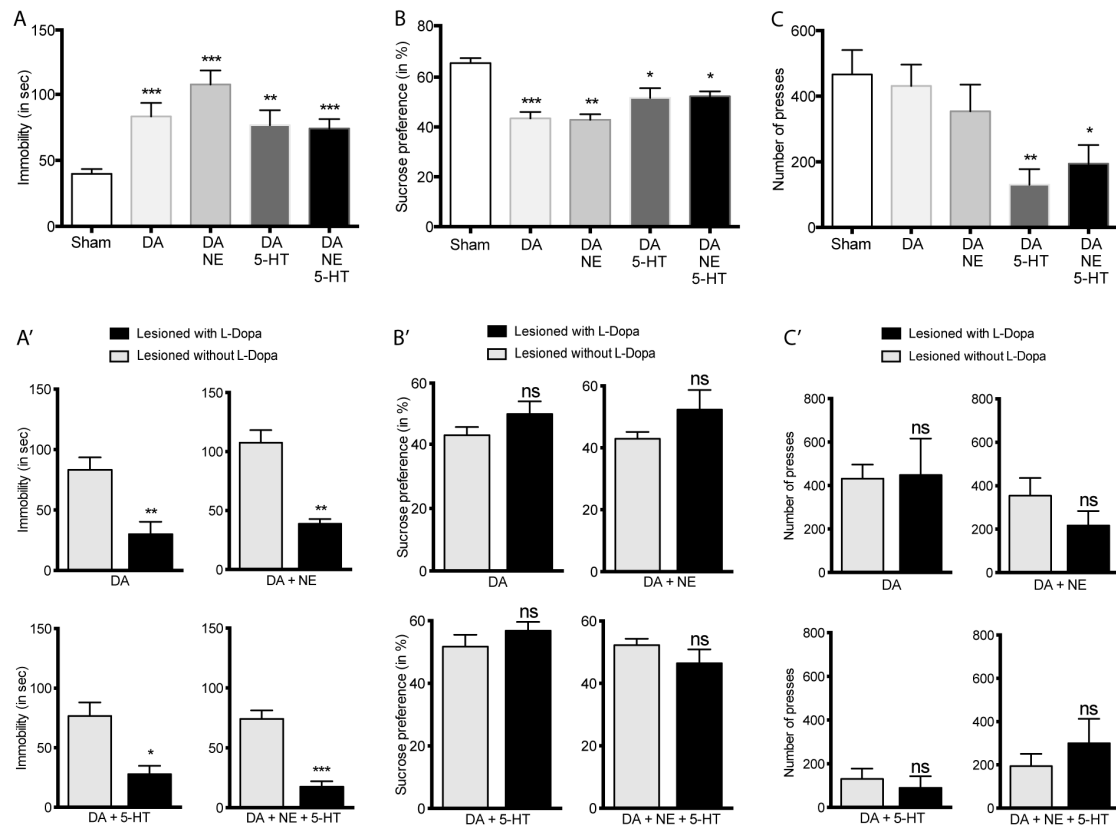


Figure 2. DA cell lesion is sufficient to induce depressive-like behavior and anhedonia which were improved by L-Dopa, whereas 5-HT lesion was necessary to induce motivation deficit. Histograms A and A' represent the immobility time in the forced swim test during the five minutes test. Histograms B and B' represent the sucrose consumption relative to the total consumption. Histograms C and C' represent the number of presses during the progressive ratio task. Values are the mean \pm SEM obtained in sham rats (n=24), DA-lesioned rats (n=9), DA and NE-lesioned rats (n=8), DA and 5-HT-lesioned rats (n=10) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=10). Histograms A, B and C show the effects of combined lesions of the monoaminergic systems and histograms A', B' and C' show the effect of L-Dopa treatment in the same groups of animals. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham-operated animals (A, B, C) and with the corresponding lesioned rats without L-Dopa treatment (A', B', C').

Effects of bilateral monoaminergic cell lesions and L-Dopa treatment on the firing activity of LHb neurons

In sham rats, the firing rate of LHb neurons corresponds to $8,6 \pm 0.9$ Hz divided in regular (7%), irregular (63%) and bursty (30%) neurons.

Bilateral DA lesion alone or combined with NE and/or 5-HT cell lesions did not modify the firing rate of the LHb neurons compared to sham operated animals (Kruskall-Wallis, $F=8,000$, $p=0.092$, Fig. 3B). However, a high tendency to decrease the firing rate in animals with combined lesions of the three monoaminergic systems was observed. Moreover, the firing pattern was not affected by the bilateral combined lesions of the monoaminergic systems compared to sham-operated rats (χ^2 test, $X^2=6,99$, $df=8$, $p>0,05$) (Fig. 3A and 3C). The absence of changes was also observed for the parameters of burst analysis (data not shown) and the coefficient of variation of the interspike intervals (One-way ANOVA, $F=2,409$, $p=0.051$, data not shown).

L-Dopa significantly increased the firing rate of LHb neurons in rats with monoamines depletions (paired t-test, $p=0.012$ compared to lesioned rats without L-Dopa) (Fig. 3B'). Concerning the firing pattern, the L-Dopa had no impact on it (χ^2 test, $X^2=0$, $df=1$, $p=1$ compared to lesioned animals, Fig. 3C').

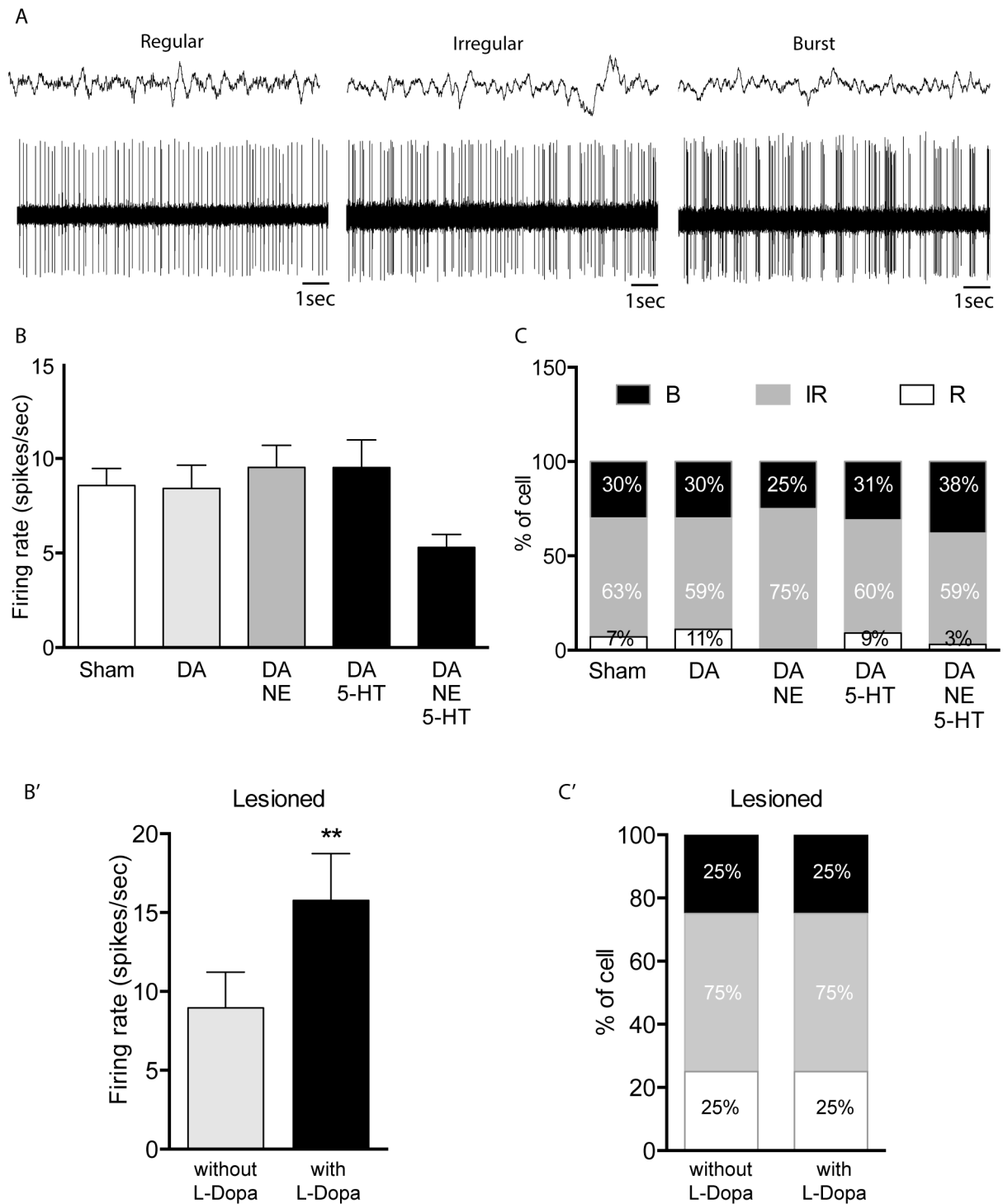


Figure 3 : Effects of monoaminergic cell lesions and L-Dopa treatment on the spontaneous firing rate and discharge patterns of Lhb neurons. A shows representative examples of recordings of the Lhb neuronal activity and cortical EEG. B represents the histogram of the firing rate (spikes/sec) of all Lhb neurons recorded in each experimental

group : sham rats (n=69), DA-lesioned rats (n=37), DA and NE-lesioned rats (n=46), DA and 5-HT-lesioned rats (n=45) and DA, NE and 5-HT-lesioned rats (n=39) and B' represents the effect of L-Dopa treatment on the firing rate in all lesioned-group of rats with pooled results (n=16). Histogram C represents the firing pattern distribution of LHb neurons discharging in a regular (R, white portion), irregular (IR, grey portion) manner or with bursts (B, black portion). C' shows the effect on L-Dopa on the firing pattern of LHb neurons. Values are mean \pm SEM; **: $p < 0.01$ in comparison with lesioned rats.

Discussion:

Our results provide new insights into the pathophysiological mechanisms underlying the mood disorder reported in PD patients. Indeed, our data demonstrate that selective bilateral DA lesions of the SNc induced depressive-like behavior as well as anhedonia and that the additional lesions of NE and 5-HT neurons did not potentiate these effects. However, we also show that additional selective bilateral lesions of 5-HT neurons in the DR induced a lack of motivation similar to the apathy reported in PD patients. Furthermore we provide evidence for the link between depressive-like behavior and the changes in the electrical activity of LHb neurons under L-Dopa treatment which reversed this non motor symptom in our model.

The 6-OHDA lesion procedures we used in our study caused selective and significant reductions in the number of TH-IR cells in the SNc and LC, and fibers in the striatum. Moreover, the 5,7-DHT caused a reduction of 5-HT neurons in the DR nucleus. Despite the focus on DA cell loss in PD, it is now admitted that this pathology is a multi-system disorder also characterized by the loss of NE cells in the locus coeruleus and 5-HT neurons in the dorsal raphe. Our animals with bilateral DA depletion can be considered as a model of depressive-like disorder and anhedonia, and those with combined bilateral depletions of DA and 5-HT can be considered as a model of apathy. We used the forced swim test, which is the

most widely recognised paradigm to evaluate the “depressive-like behavior” in the rat (Nestler *et al.*, 2002; Temel *et al.*, 2007; Delaville *et al.*, 2012). In the task, the rodents are subjected to a brief and acute period of stress and the immobility time is considered as a measurement of “behavioral despair” (Porsolt *et al.*, 1977). Another major class of tests of depression-like behaviour are tests assessing anhedonia, one of the core symptoms of depression (Treadway & Zald, 2011). Most frequently examined is the rodents’ interest in pleasurable activities such as intake of sucrose by the sucrose consumption test, based on the preference for and intake of 1% sucrose solution over water, with decreased sucrose intake interpreted as anhedonic-like behavior (Slattery *et al.*, 2007).

Our results showed that bilateral DA depletion induced depressive-like behavior and anhedonia as it increased the time of immobility in the forced swim test and decreased the sucrose consumption, respectively. This effect has not been exacerbated by the additional depletions of NE and/or 5-HT. These results provide evidence that depressive-like behavior and anhedonia are dopamine-dependent non-motor symptoms in agreement with other rodent studies (Tadaiesky *et al.*, 2008; Drui *et al.*, 2014) and clinical studies in PD patients (Thobois *et al.*, 2010).

In addition to depression and anhedonia disorders, we also found apathy, which consists in a lack of motivation. This neuropsychiatric symptom is frequent, with a prevalence of 30% to 40% in PD patients (Sockeel *et al.*, 2006) and is one of the major determinants of a reduced quality of life in PD (Benito-Leon *et al.*, 2012), even at early stages. As apathy can be assessed by the decrease of voluntary behaviors in patients (Levy & Czernecki, 2006), in the rat, we used the progressive ratio task to study this lack of motivation. More precisely, the decrease of voluntary behaviors is illustrated by the decrease of number of presses on the lever to obtain rewards. Our results showed that the additional DR 5-HT cell lesion was necessary to induce the decrease of motivation in the skinner box task. Indeed, the lack of

motivation or apathy was not found in rats with bilateral DA lesion alone or associated with NE lesion. Nevertheless, even if DA is known to be involved in motivational processes, most of the non-motor features associated with PD are presumably related to the involvement of non-dopaminergic systems, including serotonin cell lesions in the DR (Politis & Niccolini, 2014). Our results provide evidence that the origin of mood disorders are more complex than expected. Indeed, in patients, apathy and depression are two distinct entities although it is not always easy to distinguish between them. It has been suggested that apathy can occur in the absence of sadness, and depression can occur in the absence of apathy (Kirsch-Darrow *et al.*, 2006).

Another question addressed by the present study was about the impact of the monoaminergic system alterations on the effect of L-Dopa treatment on mood disorders. In parkinsonian patients, L-Dopa treatment dramatically improves the cardinal motor symptoms in PD patients (Cotzias, 1968 ; Yahr *et al.*, 1969). However, conflicting data have been reported on mood disorders (Thobois *et al.*, 2010), (Fleury *et al.*, 2014). While some clinical studies have found significant improvement of depression or hedonic tone under L-Dopa (Yahr *et al.*, 1969; Thobois *et al.*, 2010) or motivation (Czernecki *et al.*, 2002), others showed no such benefit (Marsh & Markham, 1973; Fleury *et al.*, 2014) or that L-Dopa exacerbates depression (Cherington, 1970). In rodents, conflicting data are also reported due to the tests used and the interpretation of results. Indeed, while some studies have found significant improvement of depression under L-Dopa (Winter *et al.*, 2007), improvement of motivated behaviors and related affective changes (Druj *et al.*, 2014), others showed no such benefit (Eskow Jaunarajs *et al.*, 2010). In our study, acute L-Dopa treatment significantly improved depressive-like behavior in the forced swim test in rats with bilateral DA cell lesion alone or combined with the NE and/or 5-HT depletion. However, L-Dopa had no effect on anhedonia in the sucrose

preference test and apathy in the progressive ratio task. Although several studies have found that anhedonia is a frequent symptom in patients with PD, (*for review*, Assogna *et al.*, 2011), particularly in depressed patients (Taylor & Saint-Cyr, 1990; Snaith, 1993), others indicated that anhedonia was a primary and independent phenomenon (Isella *et al.*, 2003). Anhedonia is a complex and multifactorial phenomenon that, in part, depends on the neuropsychiatric and cognitive non-motor characteristics of the patient, and in part, on the direct PD-related clinical-neurological manifestations. Thus, the anhedonia in PD patients may be heterogeneous and multidimensional phenomenon that could explain the difference of L-Dopa efficacy between depressive-like behavior and anhedonia. Furthermore, the forced swim test requires a motor act. Thus, the decrease in the immobility time after taking L-Dopa could simply be due to the improvement in motor behavior. But, we have not observed an improvement in this motor behavior with L-Dopa treatment in the skinner box task, which also requires a motor act. However, the skinner box involves voluntary locomotor movements while the forced swimming test involves the motor act "survival" of the animal. Thus, the sensitivity of these two tests in the extent of the motor act is not the same.

Together, our data provide evidence for the DA origin of depressive-like behavior and the DA/5-HT origin of apathy, illustrating the pathophysiological complexity of mood disorders in PD. This can explain the difficulty to treat these non-motor abnormalities.

In order to better understand the pathophysiology of depression in the context of PD, we investigated whether the electrical activity of LHb neurons can be influenced by the monoaminergic system lesions and also by the administration of the therapeutic dose of L-Dopa. The LHb has been shown to be involved in motivational control of behavior. Based on its prominent relations with the monoaminergic systems, the LHb acts as a central relay nucleus to form a complex and coordinated network for the regulation of important motor

behaviors and for processing of emotion and motivation-encoded information (Hikosaka, 2010; Klemm, 2004; Geisler & Trimble, 2008; Bianco & Wilson, 2009). In the context of PD, behavioral and MEMRI study in 6-OHDA rats suggested a direct link between dopamine deficiency, raphe connectivity, and depression-like behaviors and that the LHb may mediate this linkage. SNc cell degeneration is therefore likely to cause hyperactivity in the internal part of globus pallidus (GPi) and LHb neurons, which in turn down-regulates raphe excitability and connectivity, hence leading to depression (Sourani *et al.*, 2012). However, in our study, we did not find any significant changes in the firing rate and patterns of LHb neurons, except the tendency decrease of firing rate in rats with combined lesions of the three monoaminergic systems. The absence of significant changes in the firing rate may be explained by the fact that LHb receives afferent projections from both the GPi, which are hyperactive in the parkinsonian state and the ventral pallidum neurons, which are hypoactive in the parkinsonian state.

It has been suggested that DA may modulate LHb activity (Phillipson & Pycock, 1982). Indeed, stimulation of midbrain dopaminergic neurons increased the firing rate of rat LHb (Shen *et al.*, 2012 ; Kowski *et al.*, 2009). These results are consistent with ours showing that L-Dopa increased the firing rate of LHb neurons in lesioned rats. These changes paralleled the improvement of depressive-like behavior induced by L-Dopa in lesioned animals. Conversely, although L-Dopa increased the electrical activity of LHb neurons, it had no impact on the other two mood disorders, notably the lack of motivation which is 5-HT dependent according to our results. The LHb modulates the electrical activity of 5-HT neurons in the DR nucleus (*for review*, Zhao *et al.*, 2014; Wang & Aghajanian, 1977). Treatments with antidepressants that promote 5-HTergic activity have been shown to improve mood disorders, by increasing the extracellular level of DA and also 5-HT (Damsa *et al.*, 2004).

In conclusion, our data provide in vivo evidence of the role of dopamine in modulating the firing rate of LHb neurons in the context of PD as the DA replacement by L-Dopa treatment increased the response of LHb neurons that illustrates the efficacy of L-Dopa on depressive-like behavior. This highlights the important role of DA cell degeneration at the origin of the manifestation of depressive-like disorder. Furthermore, we show that apathy, which corresponds to a lack of motivation insensitive to the replacement of DA by L-Dopa, is not dependent solely to DA depletion but to the combination of DA and 5-HT cell degeneration.

Bibliography

- Ackroff, K. & Sclafani, A. (2003) Flavor preferences conditioned by intragastric ethanol with limited access training. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **75**, 223-233.
- Assogna, F., Cravello, L., Caltagirone, C. & Spalletta, G. (2011) Anhedonia in Parkinson's disease: a systematic review of the literature. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **26**, 1825-1834.
- Bastide, M.F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C.E., Fernagut, P.O. & Bezard, E. (2014) Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to l-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiology of disease*, **62**, 179-192.
- Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B. & Benazzouz, A. (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 9595-9606.
- Benito-Leon, J., Cubo, E., Coronell, C. & Group, A.S. (2012) Impact of apathy on health-related quality of life in recently diagnosed Parkinson's disease: the ANIMO study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **27**, 211-218.
- Bianco, I.H. & Wilson, S.W. (2009) The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **364**, 1005-1020.
- Boraud, T., Bezard, E., Guehl, D., Bioulac, B. & Gross, C. (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain research*, **787**, 157-160.
- Bouali-Benazzouz, R., Tai, C.H., Chetrit, J. & Benazzouz, A. (2009) Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus. *Neuroscience*, **164**, 588-596.
- Cenci, M.A. & Lundblad, M. (2006) Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry*, **99**, 381-392.
- Cherington, M. (1970) Parkinsonism, L-dopa and mental depression. *Journal of the American Geriatrics Society*, **18**, 513-516.
- Chetrit, J., Ballion, B., Laquitaine, S., Belujon, P., Morin, S., Taupignon, A., Bioulac, B., Gross, C.E. & Benazzouz, A. (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PloS one*, **4**, e6208.
- Cotzias, G.C. (1968) L-Dopa for Parkinsonism. *The New England journal of medicine*, **278**, 630.

- Czernecki, V., Pillon, B., Houeto, J.L., Pochon, J.B., Levy, R. & Dubois, B. (2002) Motivation, reward, and Parkinson's disease: influence of dopatherapy. *Neuropsychologia*, **40**, 2257-2267.
- Damsa, C., Bumb, A., Bianchi-Demicheli, F., Vidailhet, P., Sterck, R., Andreoli, A. & Beyenburg, S. (2004) "Dopamine-dependent" side effects of selective serotonin reuptake inhibitors: a clinical review. *The Journal of clinical psychiatry*, **65**, 1064-1068.
- Delaville, C., Chetrit, J., Abdallah, K., Morin, S., Cardoit, L., De Deurwaerdere, P. & Benazzouz, A. (2012) Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiology of disease*, **45**, 763-773.
- Drui, G., Carnicella, S., Carcenac, C., Favier, M., Bertrand, A., Boulet, S. & Savasta, M. (2014) Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Molecular psychiatry*, **19**, 358-367.
- Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr*, **38**, 1236-1239.
- Eskow Jaunarajs, K.L., Dupre, K.B., Ostock, C.Y., Button, T., Deak, T. & Bishop, C. (2010) Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on nonmotor sequelae in the hemiparkinsonian rat. *Behavioural pharmacology*, **21**, 627-637.
- Fleury, V., Cousin, E., Czernecki, V., Schmitt, E., Lhomme, E., Poncet, A., Fraix, V., Tropres, I., Pollak, P., Krainik, A. & Krack, P. (2014) Dopaminergic modulation of emotional conflict in Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, **6**, 164.
- Geisler, S. & Trimble, M. (2008) The lateral habenula: no longer neglected. *CNS spectrums*, **13**, 484-489.
- German, D.C., Manaye, K.F., White, C.L., 3rd, Woodward, D.J., McIntire, D.D., Smith, W.K., Kalaria, R.N. & Mann, D.M. (1992) Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Annals of neurology*, **32**, 667-676.
- Guigoni, C., Li, Q., Aubert, I., Dovero, S., Bioulac, B.H., Bloch, B., Crossman, A.R., Gross, C.E. & Bezard, E. (2005) Involvement of sensorimotor, limbic, and associative basal ganglia domains in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 2102-2107.
- Hikosaka, O. (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature reviews. Neuroscience*, **11**, 503-513.
- Hodos, W. (1961) Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science*, **134**, 943-944.

- Isella, V., Iurlaro, S., Piolti, R., Ferrarese, C., Frattola, L., Appollonio, I., Melzi, P. & Grimaldi, M. (2003) Physical anhedonia in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **74**, 1308-1311.
- Kaneoke, Y. & Vitek, J.L. (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *Journal of neuroscience methods*, **68**, 211-223.
- Kirsch-Darrow, L., Fernandez, H.H., Marsiske, M., Okun, M.S. & Bowers, D. (2006) Dissociating apathy and depression in Parkinson disease. *Neurology*, **67**, 33-38.
- Kish, S.J. (2003) Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Advances in neurology*, **91**, 39-49.
- Klemm, W.R. (2004) Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, **10**, RA261-273.
- Klinkenberg, I. & Blokland, A. (2011) A comparison of scopolamine and biperiden as a rodent model for cholinergic cognitive impairment. *Psychopharmacology*, **215**, 549-566.
- Kowski, A.B., Veh, R.W. & Weiss, T. (2009) Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience*, **161**, 1154-1165.
- Labarre D, Meissner W, Boraud T (2008) Measure of the regularity of events in stochastic point processes, application to neuron activity analysis. In: 33rd IEEE International Conference on Acoustics, pp 489-492. Las Vegas, NV.
- Levy, R. & Czernecki, V. (2006) Apathy and the basal ganglia. *Journal of neurology*, **253 Suppl 7**, VII54-61.
- Marsh, G.G. & Markham, C.H. (1973) Does levodopa alter depression and psychopathology in Parkinsonism patients? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **36**, 925-935.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C. & De Deurwaerdere, P. (2010b) Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **38**, 136-143.
- Nestler, E.J., Gould, E., Manji, H., Buncan, M., Duman, R.S., Greshenfeld, H.K., Hen, R., Koester, S., Lederhendler, I., Meaney, M., Robbins, T., Winsky, L. & Zalcman, S. (2002) Preclinical models: status of basic research in depression. *Biological psychiatry*, **52**, 503-528.
- Ni, Z.G., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D.M., Benabid, A.L. & Benazzouz, A. (2001) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain research*, **899**, 142-147.

- Paxinos, G. & Watson, C. (1996) The Rat Brain in Stereotatic Coordinates. *Academic Press, San Diego*.
- Phillipson, O.T. & Pycock, C.J. (1982) Dopamine neurones of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula. Some implications for habenular function. *Experimental brain research*, **45**, 89-94.
- Politis, M. & Niccolini, F. (2014) Serotonin in Parkinson's disease. *Behavioural brain research*.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, **266**, 730-732.
- Shen, X., Ruan, X. & Zhao, H. (2012) Stimulation of midbrain dopaminergic structures modifies firing rates of rat lateral habenula neurons. *PloS one*, **7**, e34323.
- Slattery, D.A., Markou, A. & Cryan, J.F. (2007) Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology*, **190**, 555-568.
- Snaith, R.P. (1993) Identifying depression: the significance of anhedonia. *Hospital practice*, **28**, 55-60.
- Sockeel, P., Dujardin, K., Devos, D., Deneve, C., Destee, A. & Defebvre, L. (2006) The Lille apathy rating scale (LARS), a new instrument for detecting and quantifying apathy: validation in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **77**, 579-584.
- Sourani, D., Eitan, R., Gordon, N. & Goelman, G. (2012) The habenula couples the dopaminergic and the serotonergic systems: application to depression in Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience*, **36**, 2822-2829.
- Storch, A., Schneider, C.B., Wolz, M., Sturwald, Y., Nebe, A., Odin, P., Mahler, A., Fuchs, G., Jost, W.H., Chaudhuri, K.R., Koch, R., Reichmann, H. & Ebersbach, G. (2013) Nonmotor fluctuations in Parkinson disease: severity and correlation with motor complications. *Neurology*, **80**, 800-809.
- Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C. & Takahashi, R.N. (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **156**, 830-840.
- Taylor, A.E. & Saint-Cyr, J.A. (1990) Depression in Parkinson's disease: reconciling physiological and psychological perspectives. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, **2**, 92-98.
- Temel, Y., Boothman, L.J., Blokland, A., Magill, P.J., Steinbusch, H.W., Visser-Vandewalle, V. & Sharp, T. (2007) Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic

nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 17087-17092.

- Thobois, S., Ardouin, C., Lhomme, E., Klinger, H., Lagrange, C., Xie, J., Fraix, V., Coelho Braga, M.C., Hassani, R., Kistner, A., Juphard, A., Seigneuret, E., Chabardes, S., Mertens, P., Polo, G., Reilhac, A., Costes, N., LeBars, D., Savasta, M., Tremblay, L., Quesada, J.L., Bosson, J.L., Benabid, A.L., Broussolle, E., Pollak, P. & Krack, P. (2010) Non-motor dopamine withdrawal syndrome after surgery for Parkinson's disease: predictors and underlying mesolimbic denervation. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 1111-1127.
- Treadway, M.T. & Zald, D.H. (2011) Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **35**, 537-555.
- Uekermann, J., Daum, I., Peters, S., Wiebel, B., Przuntek, H. & Muller, T. (2003) Depressed mood and executive dysfunction in early Parkinson's disease. *Acta neurologica Scandinavica*, **107**, 341-348.
- Wang, R.Y. & Aghajanian, G.K. (1977) Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science*, **197**, 89-91.
- Winter, C., von Rumohr, A., Mundt, A., Petrus, D., Klein, J., Lee, T., Morgenstern, R., Kupsch, A. & Juckel, G. (2007) Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behavioural brain research*, **184**, 133-141.
- Yahr, M.D., Duvoisin, R.C., Shear, M.J., Barrett, R.E. & Hoehn, M.M. (1969) Treatment of parkinsonism with levodopa. *Archives of neurology*, **21**, 343-354.
- Zarow, C., Lyness, S.A., Mortimer, J.A. & Chui, H.C. (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Archives of neurology*, **60**, 337-341.
- Zhao, H., Zhang, B.L., Yang, S.J. & Rusak, B. (2014) The role of lateral habenula-dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness. *Behavioural brain research*.

Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

Bien que la maladie de Parkinson soit classiquement considérée comme un trouble moteur pur avec des symptômes moteurs liés à la dégénérescence progressive des neurones DAergiques, il est maintenant admis que les déficits moteurs sont souvent associés à des symptômes non moteurs, provenant de la dégénérescence combinée des neurones DAergiques et d'autres systèmes de neurotransmetteurs. Nos données ajoutent des preuves que les systèmes NAergique et 5-HTergique sont de bons candidats et que nos animaux avec les lésions bilatérales des trois monoamines peuvent être considérés comme un modèle du stade avancé de la maladie exprimant les troubles moteurs ainsi que les troubles non moteurs. Dans ce modèle, la micro-injection bilatérale de 6-OHDA dans le MFB entraîne une déplétion sévère et sélective de la DA striatale ($\geq 90\%$) correspondant à une lésion bilatérale des neurones DAergiques de la SNc ($>65\%$) sans affecter le contenu tissulaire en NA et 5-HT ou la proportion de neurones NAergiques dans le LC et 5-HTergiques dans le RD. Notre premier modèle consistait à léser les fibres terminales des neurones NAergiques du LC et à inhiber la synthèse de la 5-HT et non pas à une réelle lésion des neurones dans le LC et le RD, respectivement. Le DSP-4 appauvrit de façon sélective le contenu tissulaire en NE (90%) et l'administration systémique de pCPA réduit de façon sélective la teneur tissulaire en 5-HT (84%). Le niveau de déplétion des monoamines est similaire à celui rapporté dans une précédente étude de notre équipe chez le rat (Delaville et al., 2012) et à celui observé lors des études biochimiques chez les patients parkinsoniens (Zarow et al, 2003; Delaville et al., 2011).

L'ajout des déplétions en NA et 5-HT nous a permis de constater l'importance des trois systèmes dans la physiopathologie et la thérapie de la maladie de Parkinson ce qui nous a

poussé à développer un nouveau modèle de lésion neuronale bilatérale des trois systèmes monoaminergiques. L'injection de la 6-OHDA dans le MFB permet, en plus de la lésion des neurones DAergiques et sans un traitement préalable à la désipramine, la diminution drastique du taux de NA cortical (>70%) correspondant à une lésion sélective des neurones NAergiques du LC (>55%). Pour finir, la 5,7-DHT induit une diminution drastique du taux de 5-HT corticale (>60%) correspondant à une lésion sélective des neurones 5-HTergiques du RD (>60%).

I. Importance des systèmes monoaminergiques dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson

1) Déficits moteurs

Notre étude fournit des preuves que la lésion bilatérale des neurones DAergiques chez le rat induit des déficits locomoteurs et que l'ajout des déplétions ou lésions des neurones NAergiques et/ou 5-HTergiques n'ont eu aucune incidence sur les paramètres locomoteurs. En effet, nous retrouvons les mêmes résultats dans les deux modèles utilisés, que ce soit lors de la déplétion en NA et 5-HT ou de la lésion à proprement parlé des neurones NAergiques du LC et 5-HTergiques du RD.

La déplétion en NA, plus que celle en 5-HT, est censée aggraver les déficits moteurs parkinsoniens, comme nous, et d'autres avons déjà montré que la déplétion en NA seule sans perte des neurones DAergiques, était en mesure de réduire l'activité locomotrice chez le rat (Delaville et al., 2012) et la souris (Rommelfanger et al., 2010). Cependant, ici, nous montrons que les déficits locomoteurs induits par la lésion DAergique ne sont pas potentialisés par la perte supplémentaire en NA et/ou 5-HT en accord avec nos résultats précédents obtenus chez le modèle de rat 6-OHDA lésé de façon unilatérale (Delaville et al.,

2012). Ces résultats sont également en accord avec d'autres études ayant montré que la lésion bilatérale 6-OHDA induit des déficits moteurs (Sakai et Gash, 1994 ; Paille et al, 2007). Sakai et Gash (1994) ont démontré que l'activité locomotrice spontanée a été réduite après des lésions bilatérales de la SNc. Il a été montré que l'activité locomotrice spontanée est maintenue comme habituelle jusqu'à ce que la perte des neurones dans le SNc ait dépassé 80% (Leenders et al., 1990; Bernheimer et al., 1973). Par conséquent, les troubles moteurs sont fortement dépendants de la lésion DAergique en accord avec son amélioration significative induite par la L-Dopa et les agonistes DAergiques (Stacy et al., 2010).

Bien que les tests du comportement moteur simple, comme l'Open field, permettent de caractériser facilement l'activité locomotrice globale (Francardo et al., 2011; Heuer et al., 2012 ; Smith et al., 2012), l'analyse plus précise du handicap moteur permet d'étudier des fonctions plus complexes. Le « Catwalk » permet d'étudier les troubles de la marche, un composant des troubles axiaux observés chez les patients parkinsoniens. En effet, des petits pas avec une position inclinée vers l'avant sont les critères de diagnostic de la maladie de Parkinson dans les premiers stades (Devos et al., 2010). Les déficits de la marche sont caractérisés par un dysfonctionnement spatial et temporel (Westin et al., 2012). En effet, un regard sur le paramètre de la démarche statique (longueur du pas) a montré que la déplétion bilatérale en DA induit une anomalie de la démarche. En effet, la longueur du pas a été réduite et non aggravée par l'ajout des déplétions monoaminergiques. Là encore, l'origine DAergique des symptômes moteurs est illustrée. Ce symptôme est similaire à la situation clinique dans laquelle les patients parkinsoniens marchent à petits pas (Kemoun & Defebvre, 2001) avec une variabilité qui augmente en fonction des stades cliniques de Hoehn et Yahr (Hoehn et Yahr., 2001; Blin et al., 1990). En effet, progressivement, la démarche est composée de petits pas et des difficultés se produisent pour le démarrage du mouvement (retard de l'initiation de la marche) (Kemoun et Defebvre, 2001). Toutefois, l'ajout des

déplétions en NA et/ou 5-HT est nécessaire pour induire la diminution de la vitesse de la patte pendant la marche. La lenteur observée, n'a pas été retrouvée chez les rats avec la déplétion DAergique seule. De plus, l'ajout de la lésion NAergique et/ou 5-HTergique est nécessaire pour induire une diminution du « temps moteur » dans la boîte Skinner. En effet, là encore, la baisse du temps d'exécution du mouvement n'est pas détectée chez les rats avec une perte en DA seule. Une autre étude utilisant la lésion DAergique associée à celle de la NA a montré une tendance à la baisse du temps de mouvement (Lindgren et al., 2014), mais avec un effet non significatif probablement dû à la seule lésion unilatérale effectuée chez le rat. De plus, Lindgren et al (2014) ont montré que la NA pourrait également jouer un rôle important en contribuant aux performances relatives à l'attention dans le CRTT. Cependant, il est peu probable que la diminution du « temps moteur » soit une conséquence de la diminution de l'attention comme il n'y a pas de différence entre les différents groupes de rats pour le temps de réaction. En vue des résultats, nous suggérons que l'ajout des lésions en NA et/ou en 5-HT pourrait déclencher une bradykinésie et akinésie chez les rats comme ces deux lésions entraînent une lenteur des mouvements dans le « Catwalk » ainsi que la lenteur d'initiation des mouvements dans la boîte de Skinner, respectivement.

Les déficits moteurs globaux, illustrés par l'activité locomotrice spontanée, la vitesse et les perturbations du type de démarche, observés chez les rats présentant une déplétion bilatérale en DA sont similaires à ceux observés chez les patients lorsque 70 à 80% du niveau de DA striatale normale est perdu (Hornykiewicz, 1975 ; McNamara et al., 2006). Cependant, l'étude des paramètres de la motricité fine comme la vitesse du pas ou le « temps du mouvement » a montré que la diminution bilatérale en DA seule n'est pas suffisante pour déclencher l'akinésie et la bradykinésie comme la lenteur des mouvements apparaît lorsque les déplétions NEergiques et/ou 5-HTergiques sont présentes. Fait intéressant, l'hypokinésie est la première à apparaître chez les patients parkinsoniens et est responsable de la diminution de la vitesse

du mouvement (Moreau et al., 2010). Notre étude pourrait alors être compatible avec la théorie de Braak (Braak et Del Tredici, 2008), qui stipule que les premiers symptômes moteurs apparaissent lorsque les neurones NAergiques et/ou 5-HTergiques disparaissent en plus de la dégénérescence des neurones DAergiques. En effet, Braak a proposé une dégénérescence caudo-rostrale progressive des neurones affectant les systèmes monoaminergiques à l'origine de la symptomatologie de la maladie de Parkinson. Le système NAergique du LC serait le premier système altéré, suivi par la dégénérescence des neurones 5-HTergiques du RD (Hornung, 2003), tous deux impliqués dans la manifestation des symptômes moteurs. En effet, la résistance des troubles de la marche à la L-Dopa peut être liée à la propagation de la neurodégénérescence des structures non dopaminergiques directement impliquées dans le contrôle de la marche. Le système NAergique est rapidement et sévèrement affecté, conduisant à un impact majeur sur le trouble moteur. En effet, la maladie de Parkinson présente un spectre plus large de symptômes moteurs lorsque les dégénérescences en DA et NA sont combinées (Narabayashi et al., 1991). Plusieurs études ont également signalé l'implication de la voie NAergique du LC dans le « freezing » (Sandyk, 1996 ; Ringendahl & Sierla, 1997 ; Devos et al., 2010), l'instabilité posturale et l'akinésie (Narabayashi et al., 1991). Plus récemment, une étude a montré que la dégénérescence des neurones NAergiques chez des rats 6-OHDA contribue à des troubles moteurs, notamment dans les tâches mettant en jeu la patte ciblée (Shin et al., 2014). Les perturbations associées à la dégénérescence des neurones 5-HTergic paraissent moins sévères, même si les interactions entre les systèmes 5-HTergique et DAergique sont nombreuses et complexes. En effet, la modulation 5-HTergique des ganglions de la base peut être pertinente pour le traitement de la maladie de Parkinson et des complications motrices induites par le traitement chronique à la L-Dopa (Carta et al., 2007 ; Eskow et al., 2009 ; Rylander et coll., 2010). Cependant, l'implication relative de la NA et de la 5-HT n'est pas illustrée dans notre étude, car il n'y a

pas de différence entre les groupes lésés. De plus, la déplétion combinée en DA, NA et 5-HT n'a pas montré d'aggravation des troubles moteurs. De façon intéressante, nous avons observé une différence significative des taux de déplétions 5-HTergiques entre les groupes de rats avec des déplétions en DA et 5-HT et avec la déplétion combinée des trois systèmes monoaminergiques, même si le protocole était exactement le même. Ce résultat confirme l'interaction entre les systèmes monoaminergiques. En effet, les études anatomiques et électrophysiologiques précédentes ont montré l'existence de relations réciproques et fonctionnelles entre les trois systèmes monoaminergiques (Aston-Jones et al, 1991 ; Guiard et al, 2008).

Le tableau ci-dessous résume l'impact des déplétions monoaminergiques sur les troubles moteurs observés.

	Activité locomotrice globale		Paramètre de la démarche	Lenteur des mouvements Akinésie/ Bradykinésie	
Modèle utilisé	6-OHDA, DPS-4 pCPA	6-OHDA 5,7-DHT			
	Nombre de mouvements	Distance et vélacité	Longueur des pas	Vitesse des pas	tps du mouvement Vitesse d'initiation
DA	↘	↘	↘	0	0
DA + NE	↘	↘	↘	↘	↘
DA + 5HT	↘	↘	↘	↘	↘
DA + NE + 5-HT	↘	↘	↘	↘	↘

2) Anxiété

Afin d'étudier les troubles anxieux, nous avons utilisé le test du labyrinthe en croix surélevées (EPM), un paradigme bien validé et largement utilisé pour évaluer l'état associé à l'anxiété relative des rongeurs (Carobrez et Bertoglio, 2005 ; Delaville et al., 2012a). Le paradigme est basé sur le conflit entre les tendances innées des animaux pour explorer de nouveaux

environnements par rapport à leur tendance innée à éviter les zones ouvertes où le thigmotaxis est impossible, et d'avoir peur des hauteurs (Bourin et al., 2007 ; File, 2001).

Nos résultats montrent que la lésion bilatérale des neurones DAergiques induit un comportement anxieux car elle réduit le nombre d'entrées dans les extrémités et le temps passé dans les bras ouverts par rapport à des rats contrôles. Cet effet anxiogène n'a pas été exacerbé par l'ajout des lésions des neurones NAergiques et/ou 5-HTergiques. Ces résultats fournissent des preuves que le comportement anxieux est un symptôme non moteur dopamine-dépendant en accord avec de précédentes études cliniques chez les patients parkinsoniens, (pour revue, Chaudhuri & Schapira, 2009). Nos résultats montrent également que la nature bilatérale de la lésion des neurones DAergiques chez le rat était nécessaire pour induire un comportement anxieux contrairement à une étude précédente de notre équipe dans laquelle la lésion unilatérale en DA seule n'était pas suffisante pour induire l'anxiété. Ce trouble du comportement a été développé uniquement lorsque la lésion en DA s'est accompagnée de la déplétion NAergique et/ou 5-HTergique (Delaville et al., 2012a). Cependant, nos résultats sont cohérents avec les données précédentes, qui ont montré que les comportements liés à l'anxiété chez le rat, en utilisant le même test EPM, ont été observés après lésion bilatérale des neurones DAergiques de la SNc (Tadaiesky et al, 2008 ; Drui et al, 2014). L'ensemble de ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'anxiété n'est pas simplement une conséquence de la déficience motrice, mais reflète un état pathologique propre de la maladie. En effet, nos résultats confirment l'hypothèse que l'anxiété et la maladie de Parkinson pourraient avoir des mécanismes biologiques communs sous-jacents, tels que les anomalies dans la neurotransmission DAergique. Ceci est cohérent avec les résultats montrant que le "binding" avec les récepteurs DAergiques ainsi que le niveau de DA sont réduits dans le striatum des modèles animaux et des humains souffrant de troubles anxieux (*pour revue,*

Kano, O et al., 2010, Park. Dis.). Par conséquent, les comportements anxieux sont fortement dépendants de la diminution en DA en accord avec les études montrant une amélioration significative de l'anxiété après traitement à la L-Dopa et les agonistes DAergiques (Funkiewiez et al., 2006; Maricle et al., 1995; Stacy et al., 2010). Nos résultats fournissent de nouvelles évidences sur les mécanismes physiopathologiques sous-jacents du trouble anxieux décrits chez les patients parkinsoniens.

3) Dépression

Nous avons utilisé le test de nage forcée, qui est le paradigme le plus largement reconnu pour évaluer le "comportement dit dépressif" chez le rat (Nestler et al., 2002 ; Temel et al., 2007 ; Delaville et al., 2012). Dans ce test, les rongeurs sont soumis à une période courte de stress aigu et la durée d'immobilité est considérée comme une mesure du "désespoir comportemental" (Porsolt et al., 1977).

Nous montrons que le comportement "dit dépressif", modéré chez les rats avec une lésion en DA seule, est considérablement aggravé chez le rat présentant une déplétion combinée des trois monoamines. Le comportement "dit dépressif" observé chez nos animaux ne peut pas être une conséquence des déficits moteurs dans la mesure où les animaux présentant une déplétion combinée des trois monoamines développent une augmentation drastique du temps d'immobilité dans le FST sans potentialisation du déficit locomoteur. De plus, les animaux avec des déplétions combinées en DA et NA ou DA et 5-HT n'ont pas montré de comportement "dit dépressif", alors qu'ils ont développé un déficit locomoteur similaire aux animaux avec la lésion DAergique seule ou avec la déplétion combinée des trois monoamines. Nos résultats fournissent la preuve que la perte des neurones DAergiques joue un rôle dans la manifestation d'un stade modéré de la dépression alors que la perte supplémentaire en NA et en 5-HT est à l'origine de la dépression sévère exprimée chez des patients à un stade avancé

de la maladie de Parkinson. Ceci peut être expliqué par le fait que ce trouble non moteur pourrait être la conséquence de la perte de l'interaction des trois systèmes monoaminergiques. En effet, des études *in vivo* de microdialyse ont indiqué que l'amélioration du comportement "dit dépressif" induit par les antidépresseurs s'accompagne d'une augmentation du niveau de DA, NA et 5-HT (Damsa et al, 2004 ; Hajos-Korcsok et al, 2000).

Cependant, contrairement à l'utilisation du DSP-4 et de la pCPA, lors de l'étude suivante dans laquelle nous avons procédé à des lésions des neurones DAergiques, NAergiques et 5-HTergiques, nous n'avons pas retrouvé d'aggravation du trouble dépressif chez les rats avec les trois lésions. En effet, nos résultats montrent que le comportement "dit-dépressif" induit par la lésion bilatérale en DA n'a pas été exacerbé par les lésions supplémentaires en NA et/ou en 5-HT. Ces résultats montrent que le comportement "dit-dépressif" est un symptôme en partie dépendant de la DA même si l'interaction avec les autres monoamines semblent être importante. Nous mettons également en évidence l'intérêt des deux modèles utilisés pour étudier des stades avancés de ce trouble complexe.

Cette étude fournit aussi de nouvelles évidences sur les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux troubles de l'humeur rapportés chez les patients parkinsoniens. Une autre classe de tests mettant en évidence les troubles de l'humeur est celle permettant d'évaluer les comportements d'anhédonie, l'un des principaux symptômes de la dépression (Treadway & Zald, 2011). Le principe consiste à étudier l'intérêt des rongeurs dans des activités agréables tels que la consommation de sucre sur la base de la préférence pour la consommation de solution de sucre à 1% par rapport à l'eau, avec la diminution de la consommation de sucrose interprétée comme un comportement anhédonique (Slattery et al., 2007).

Nos résultats montrent que la lésion bilatérale des neurones DAergiques induit un comportement anhédonique. Cet effet n'a pas été exacerbé par l'ajout des lésions en NA et/ou 5-HT. Ces résultats fournissent des preuves que l'anhédonie est un symptôme non moteur

dépendant de la DA, en accord avec d'autres études chez des rats ayant subi la dégénérescence bilatérale partielle des neurones DAergiques de la SNc (Drui et al., 2014) et des études cliniques chez les patients parkinsoniens (Thobois et al., 2010).

En plus de la dépression et des troubles anhédoniques, nous nous sommes intéressés également à l'apathie, qui se caractérise par le manque de motivation. Ce symptôme neuropsychiatrique est fréquent, avec une prévalence de 30 à 40% chez les patients parkinsoniens (Sockeel et al., 2006) et est l'un des principaux déterminants de la diminution de la qualité de vie chez les patients parkinsoniens (Benito-Leon et al., 2012), même à des stades précoces. L'apathie peut être évaluée par la diminution des comportements volontaires chez les patients (Levy & Czernecki, 2006); chez le rat, nous avons utilisé la tâche du "progressive ratio" dans la boîte de Skinner qui permet d'étudier ce manque de motivation. Plus précisément, la diminution des comportements volontaires est illustrée par la diminution du nombre d'appuis sur le levier pour obtenir des récompenses. Nos résultats montrent que l'ajout de la lésion des neurones 5-HTergiques du RD était nécessaire pour induire la diminution de la motivation. En effet, le manque de motivation ou d'apathie n'a pas été décelé chez les rats avec la lésion bilatérale DAergique seule ou associée à une lésion NAergique. Néanmoins, même si la DA est connue pour être impliquée dans les processus motivationnels, la plupart des troubles non moteurs associés à la maladie de Parkinson sont vraisemblablement liés à la participation des systèmes non dopaminergiques, y compris les lésions cellulaires en 5-HT dans le RD (Politis et Niccolini, 2014). Nos résultats fournissent la preuve que l'origine des troubles de l'humeur est plus complexe que prédit. En effet, chez les patients, l'apathie et la dépression sont deux entités distinctes mais il n'est pas toujours facile de les distinguer. En effet, il a été suggéré que l'apathie peut apparaître en l'absence de la dépression et que la dépression peut se manifester en l'absence d'apathie (Kirsch-Darrow et al., 2006).

Le tableau ci-dessous résume l'impact des lésions monoaminergiques sur les troubles anxieux et de l'humeur.

	Anxiété		Comportement "dit dépressif"		Anhédonie	Apathie
	6-OHDA DPS-4 pCPA	6-OHDA 5,7- DHT	6-OHDA DPS-4 pCPA	6-OHDA 5,7-DHT	6-OHDA 5,7-DHT	
DA	↗	↗	↗	↗	↗	0
DA + NE	↗	↗	0	↗	↗	0
DA + 5HT	↗	↗	0	↗	↗	↗
DA + NE + 5-HT	↗	↗	↗↗	↗	↗	↗

II. Impact des lésions monoaminergiques sur l'efficacité des traitements antiparkinsoniens

La restauration de la transmission DAergique par la L-Dopa est utilisée avec succès pour améliorer de façon spectaculaire les symptômes moteurs cardinaux pendant plusieurs années (Cotzias, 1968). Cependant, après 4 à 6 ans de traitement, les patients développent des fluctuations importantes du comportement moteur, la perte d'efficacité et diverses complications telles que des dyskinésies, ce qui représente une détérioration majeure de la qualité de vie des patients. De plus, l'impact de la L-Dopa sur les troubles de l'humeur est largement controversé. La stimulation cérébrale profonde (SCP) à haute fréquence du noyau sous-thalamique (STN) a été proposée comme une excellente alternative. Ceci a été démontré chez les singes traités au MPTP (Benazzouz et al., 1993, 1996) qui a permis son transfert avec succès chez les patients parkinsoniens souffrant d'un stade avancé de la maladie. La SCP du NST est actuellement reconnue comme le traitement neurochirurgical de choix pour améliorer la performance motrice chez les patients; cependant, les données de la littérature sont divergentes concernant ses effets sur les troubles du comportement, dans la mesure où les troubles non moteurs post-opératoires sont influencés non seulement par la stimulation elle-

même, mais aussi par une réduction de la prise des médicaments, conduisant à un syndrome de sevrage de la dopamine (Krack et al., 2010).

1) L-Dopa

Chez les patients parkinsoniens, peu de travaux ont étudié l'efficacité de la L-Dopa sur le trouble anxieux, avec des résultats contradictoires, (pour revue, Eskow Jaunarajs et al., 2011). Alors que certaines études ont montré une amélioration significative de l'anxiété par la L-Dopa (Funkiewiez et al., 2006; Stacy et al., 2010), d'autres n'ont pas montré une telle efficacité et certains ont même montré que la L-Dopa aggrave le trouble anxieux (Maricle et al., 1995; Fetoni et al., 1999). Dans notre étude, l'administration aiguë de L-Dopa a considérablement et significativement amélioré le comportement anxieux chez les rats avec des lésions bilatérales de neurones DAergiques. Ce résultat est en accord avec celui d'une étude montrant que le comportement anxieux dans l'EPM a été amélioré par la L-dopa et le ropinirole (un agoniste des récepteurs dopaminergiques D2/D3) chez les rats porteurs d'une lésion partielle et bilatérale de la SNc (Druj et al., 2014). En outre, nous montrons que le même effet bénéfique de la L-dopa a été également observé chez les animaux présentant des lésions supplémentaires des neurones NAergiques du LC, mais pas chez les rats avec une lésion combinée des neurones DAergiques et 5-HTergiques. Ces résultats sont consistents avec l'hypothèse selon laquelle la conversion de la L-Dopa en DA a lieu dans les neurones 5-HTergiques quand les neurones DAergiques ont dégénéré dans la maladie de Parkinson. Ceci est en accord avec les résultats biochimiques, qui ont montré que les neurones 5-HTergiques sont à l'origine de l'augmentation diffuse dans la transmission de DA induite par la L-dopa chez le rat 6-OHDA (Navailles et al., 2010a). Par conséquent, dans notre étude, la perte des neurones 5-HTergiques, en plus de la perte des neurones DAergiques compromet la conversion de la L-Dopa de DA, ce qui entraîne l'absence d'efficacité de la L-Dopa dans l'amélioration de l'anxiété. Nos données suggèrent donc que chez les patients parkinsoniens

sans réponse au traitement à la L-Dopa, les neurones 5-HTergiques peuvent probablement être affectés par l'évolution naturelle de la maladie.

Une autre question abordée dans cette thèse portait sur l'impact des déplétions monoaminergiques sur l'effet du traitement sur les troubles associés à la dépression. Chez les patients parkinsoniens, les données rapportées sur les troubles de l'humeur sont controversées (Thobois et al., 2010 ; Fleury et al., 2014). Alors que certaines études cliniques ont montré une amélioration significative de la L-Dopa sur la dépression (Yahr et al., 1969 ; Thobois et al., 2010) et la motivation (Czernecki et al., 2002), d'autres n'ont pas montré un tel bénéfice (Marsh et Markham, 1973; Fleury et al., 2014) ou que la L-Dopa aggravait la dépression (Cherington, 1970). Chez les rongeurs, des données controversées ont également été trouvées en raison des tests utilisés et de l'interprétation des résultats. En effet, alors que certaines études ont montré que la L-Dopa améliorait de façon significative le comportement dit dépressif (Winter et al., 2007), les comportements motivés et affectifs (Drui et al., 2014), d'autres n'ont pas montré un tel effet positif (Eskow Jaunarajs et al., 2010). Dans notre étude, le traitement aigu à la L-Dopa a considérablement amélioré le comportement « dit-dépressif » dans le test de la nage forcée chez les rats avec la lésion bilatérale des neurones DAergiques seule ou combinée avec celle des neurones NAergiques et/ou 5-HTergiques. Ici l'hypothèse selon laquelle la conversion de la L-Dopa en DA a lieu dans les neurones 5-HTergiques, est remise en question puisque la lésion des neurones 5-HTergiques n'interfère pas avec son efficacité. De plus, la L-dopa n'a pas eu d'effet sur l'anhédonie dans le test de la préférence au sucrose et sur l'apathie dans la boîte de Skinner. Bien que plusieurs études ont démontré que l'anhédonie est un symptôme fréquent chez les patients atteints de la maladie (pour revue, Assogna et al., 2011), en particulier chez les patients déprimés (Taylor et Saint-Cyr, 1990; Snaith, 1993), d'autres ont indiqué que l'anhédonie est un phénomène primaire et indépendant (Isella et al., 2003). L'anhédonie est un phénomène complexe et multifactoriel qui, en partie,

dépend des caractéristiques non motrices neuropsychiatriques et cognitives du patient, et d'autre part, des manifestations cliniques neurologiques directement liées à la maladie de Parkinson. Ainsi, l'anhédonie chez les patients parkinsoniens peut être un phénomène hétérogène et multidimensionnel qui pourrait expliquer la différence d'efficacité de la L-Dopa entre le comportement de type dépressif et l'anhédonie. De plus, le test de nage forcée nécessite un acte moteur. Ainsi, la diminution du temps d'immobilité après la prise de la L-Dopa aurait pu simplement être due à l'amélioration du comportement moteur. Cependant, nous n'avons pas observé une amélioration du comportement moteur avec traitement à la L-Dopa dans la tâche de la boîte de Skinner, qui nécessite également un acte moteur. Mais la boîte de Skinner implique des mouvements locomoteurs volontaires alors que le test de la nage forcée implique un acte moteur de « survie » chez l'animal. Ainsi, la sensibilité de ces deux tests dans la mesure des paramètres de l'acte moteur n'est pas la même.

Nos données confirment l'origine DAergique du comportement de type anxieux et dépressif par son amélioration suite à la restauration de la transmission DAergique par la L-Dopa. Cependant, les autres monoamines peuvent interférer avec l'efficacité de la L-Dopa sur les troubles anxieux et l'anhédonie ou encore l'apathie illustrant la complexité physiopathologique des troubles de l'humeur dans la maladie de Parkinson. Cela peut expliquer la difficulté à traiter ces anomalies non motrices.

Le tableau ci-dessous résume l'impact des lésions monoaminergiques sur l'efficacité de la L-Dopa.

	Anxiété	Dépression	Anhédonie	Apathie
DA			0	0
DA + NE			0	0
DA + 5HT	0		0	0
DA + NE + 5-HT	0		0	0

2) Stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique





Dans notre étude, nous avons également mis en évidence l'impact des déplétions monoaminergiques sur l'efficacité de la stimulation cérébrale profonde (SCP) du noyau sous-thalamique (NST).

Comme attendu, la SCP du NST a nettement inversé les déficits locomoteurs chez les animaux présentant une déplétion bilatérale en dopamine (DA). Toutefois, ces améliorations ont été réduites par la déplétion supplémentaire de la noradrénaline (NA) et de la sérotonine (5-HT), ce qui indique que la perte de ces monoamines peut interférer avec l'efficacité de la SCP du NST sur les déficits parkinsoniens. Comme cette approche neurochirurgicale a été rapportée comme mimant l'efficacité de la L-Dopa (Benazzouz et al, 1996; Limousin et al, 1998; Krack et al, 2003), nos résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les animaux avec les déplétions combinées en DA et NA qui ont montré une amélioration moins importante des déficits moteurs en réponse à la L-Dopa par rapport aux animaux avec une lésion DAergique seule. Comme nos animaux lésés peuvent être considérés comme un modèle du stade avancé de la maladie, nos résultats corroborent ceux décrits par plusieurs études cliniques montrant que l'effet bénéfique de la SCP du NST sur les troubles moteurs diminue avec la progression naturelle de la maladie (Krack et al., 2003; Volkmann et al., 2009; Fasano et al., 2010; Castrioto et al., 2011). En effet, Fasano et ses collègues ont montré que l'amélioration du comportement moteur global rapporté à 5 ans (56%) n'a été que partiellement maintenue à 8 ans (39%). Sur la base de ces données cliniques, les résultats expérimentaux permettent de suggérer que lors de la progression de la maladie, la dégénérescence des neurones NAergiques et 5-HTergiques, qui accompagne la perte neuronale DAergique, peut interférer avec les circuits impliqués dans l'effet thérapeutique de la SCP du NST et par conséquent les symptômes deviennent résistants à la stimulation.

Malgré l'amélioration des troubles moteurs, plusieurs études cliniques ont montré que la SCP du NST peut provoquer, chez certains patients, des complications neuropsychiatriques, comme l'anxiété et la dépression, qui peuvent dégrader la qualité de vie des patients (Temel et al., 2006 ; Voon et al., 2008). Contrairement à certaines données de la littérature, nos résultats fournissent la preuve que la stimulation aiguë du NST améliore les troubles anxieux et « dit dépressifs » chez les animaux présentant une déplétion bilatérale en DA. De plus, nous avons montré que la SCP du NST a également amélioré le comportement « dit dépressif » chez les animaux avec des déplétions combinées des trois monoamines qui était à l'origine d'une forte immobilité dans le test de la nage forcée. Nos résultats sont en accord avec les études cliniques montrant que la SHF du NST exerce des effets bénéfiques sur les troubles de l'humeur (Eisenstein et al., 2014; Campbell et al., 2012; Czernecki et al., 2005; Funkiewiez et al., 2004; Schneider et al., 2003) avec une efficacité encore plus prononcée chez les patients parkinsoniens atteints de dépression ou d'anxiété que ceux qui ne répondaient pas aux critères de seuil pour le diagnostic (Eisenstein et al., 2014). Cependant, nos résultats contrastent avec d'autres études cliniques montrant que la SCP du NST induit des effets néfastes sur l'humeur (pour revue, Temel et al., 2005). Néanmoins, les troubles de l'humeur induits par la SCP du NST semblent se produire dans seulement quelques cas de patients stimulés car la majorité des études ont rapporté des cas isolés (Doshi et al, 2002; Houeto et al, 2002; Temel et al, 2005). De façon intéressante, nos résultats montrent que, chez les animaux présentant une déplétion combinée en DA et NA ou DA et 5-HT, qui n'ont pas développé un comportement "dit dépressif", la SCP du NST n'exerce pas d'effets négatifs sur l'immobilité dans le test de la nage forcée. Ces résultats démontrent que la stimulation aiguë du NST n'est pas capable d'induire un comportement "dit dépressif" ce qui suggère que ces désordres sont dus à la perturbation des circuits neuronaux, impliquant le NST, qui est extrêmement sensible et réceptif à la stimulation. En outre, l'amélioration du comportement "dit dépressif" par la SCP

du NST n'est pas due à l'amélioration de la fonction motrice étant donné que chez les animaux avec les déplétions combinées des trois monoamines nous avons seulement observé une amélioration partielle, non significative, des déficits locomoteurs. Les différences entre les différentes études peuvent être expliquées par les différences de caractéristiques des patients et de leur vulnérabilité préopératoire mais également de l'intervention chirurgicale et d'une réduction de la prise de médicament, conduisant à un syndrome de sevrage de la dopamine avec des possibles augmentations de l'anxiété et de la dépression (Thobois et al., 2008; Czernecki et al., 2008 ; Krack et al., 2010). Les résultats d'une étude multicentrique sont en faveur d'une contribution majeure de l'arrêt du traitement DAergique dans la manifestation de l'humeur dépressive (Thobois et al., 2010). Les données cliniques accumulées sont source de confusion mais notre étude confirme la nécessité d'une évaluation psychiatrique pré-opératoire plus précise ainsi que la nécessité d'un suivi post-opératoire attentif (Bronstein et al., 2011 ; Voon et al., 2008). Les effets psychiatriques induits par la SCP chez les patients pourraient aussi être expliqués par la diffusion de la stimulation à la SNr, qui est située ventralement par rapport au NST. À cet égard, trois études ont décrit une dépression aiguë causée par le placement des électrodes et la stimulation accidentelle dans le SNr (Bejjani et al, 1999; Blomstedt et al, 2008; Tommasi et al, 2008). Cela a été reproduit dans des modèles animaux par l'équipe de Temel (Tan et al., 2013), qui a montré que la SCP de la SNr a pu déclencher un comportement "dit dépressif" lié à un taux en 5-HT extracellulaire diminué dans le cortex préfrontal médian.

Le tableau ci-dessous résume l'impact des lésions monoaminergiques sur l'efficacité de la SCP du NST sur les troubles moteurs et non moteurs.

	Activité locomotrice	Anxiété	Comportement "dit dépressif"
DA			
DA + NE	0	0	0
DA + 5HT	0	0	0
DA + NE + 5-HT	0	0	

III. Lien entre les lésions monoaminergiques, les troubles parkinsoniens et leurs structures impliquées

1) NST

L'hypothèse d'une convergence des trois monoamines impliqués dans le comportement moteur est compatible avec nos données électrophysiologiques montrant, dans tous les groupes lésés, une augmentation du nombre de neurones du NST déchargeant en bouffées et de façon irrégulière en accord avec notre précédente étude (Delaville et al., 2012). En effet, des études électrophysiologiques in vitro et in vivo ont montré que les trois monoamines modulent l'activité électrique des neurones du NST (Arcos, 2003 ; Baufreton et al., 2005; Delaville et al., 2012b; Belujon et al., 2007). De plus, nous montrons que la déplétion additionnelle en 5-HT augmente la proportion des neurones déchargeant en bouffées, en parallèle avec la manifestation de l'akinésie et de la bradykinésie, chez les rats avec l'ajout de la déplétion 5-HTergique.

2) Amygdale basolatérale

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'anxiété dans le contexte de la maladie de Parkinson, nous avons examiné si l'activité électrique des neurones du noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) peut être influencée par les lésions des systèmes monoaminergiques et également par l'administration d'une dose thérapeutique de L-Dopa. La BLA a été décrite comme jouant un rôle clé dans l'anxiété et les comportements liés à la peur (Lalumière, 2014) et nos résultats ont montré que la lésion des neurones DAergiques induit une tendance à la baisse de la fréquence de décharge des neurones de la BLA. Ceci est en accord avec une autre étude montrant qu'une lésion bilatérale partielle DAergique de la voie nigro-striée a été à l'origine d'une diminution significative de la fréquence de décharge des neurones de la BLA (Chen et al., 2011). Cependant, nos résultats, ainsi que ceux de Chen et ses collègues montrent que la perte des neurones DAergiques n'avait pas d'influence sur le mode de décharge de ces mêmes neurones. De plus, comme pour le comportement anxieux, la diminution de la fréquence de décharge n'a pas été potentialisée par la lésion supplémentaire de NA et/ou de 5-HT. Ces résultats sont en accord avec le fait que les neurones de la BLA reçoivent une dense innervation DAergique et expriment les récepteurs D1 et D2 (Scibilia et al., 1992). Il a également été montré une diminution de la densité des fibres TH positives dans la BLA, le noyau latéral et central de l'amygdale chez des souris traitées par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (von Bohlen und Halbach et al., 2005), et que la dégénérescence des neurones DAergiques dans la SNc produit une diminution spectaculaire de la DA et de ses principaux métabolites dans les zones de projection DAergiques dont la BLA (Scatton et al., 1983). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la DA joue un rôle dans la modulation de la fréquence de décharge, mais pas le pattern des neurones du BLA et que la dégénérescence des cellules DAergiques dans le contexte de la maladie de Parkinson résultent en une modification de la fréquence de décharge, à l'origine de la manifestation des

troubles anxieux. Le fait que nous ayons trouvé une tendance à la diminution de la fréquence de décharge à la différence de la diminution significative rapportée par Chen et al. (2011) peut s'expliquer par les différences dans les méthodes de lésion et les anesthésiques utilisés. En effet, nous avons injecté la 6-OHDA dans le MFB, et non dans le striatum, afin d'obtenir une perte importante des neurones DAergiques dans le SNc (> 60%) par rapport à la lésion bilatérale partielle (30%) obtenue par Chen et ses collègues (2011). En ce qui concerne l'anesthésique, dans notre étude, nous avons utilisé de l'uréthane, alors que Chen et ses collègues ont utilisé de l'hydrate de chlorale, tous deux ayant différents mécanismes et impacts sur l'activité neuronale (Li et al., 2012).

Nous avons ensuite étudié l'effet de la L-Dopa sur l'activité des neurones de la BLA. Nos résultats montrent que la L-Dopa a augmenté de manière significative la fréquence de décharge des neurones de la BLA chez les rats avec une lésion bilatérale DAergique seule ou combinée avec la lésion NAergique pour se rapprocher du niveau basal des rats contrôles. Ces changements sont en parallèle avec l'amélioration du comportement anxieux induit par la L-Dopa chez les animaux lésés. Nos résultats sont conformes à ceux d'une étude précédente, utilisant des approches d'imagerie basées sur la mesure du niveau d'oxygénation du sang (Tessitore et al., 2002). Leurs données ont révélé une forte réponse bilatérale de l'amygdale à l'information sensorielle chez les sujets contrôles et qui était absente chez les patients parkinsoniens en état hypodopaminergique. La restauration du taux de DA restaure partiellement cette réponse chez les patients parkinsoniens. Toutefois, et de la même manière que l'absence de changements des effets sur le comportement, la L-Dopa n'a pas changé la fréquence de décharge des neurones dans la BLA chez les rats avec une lésion supplémentaire des neurones 5-HTergiques. Comme pour le comportement anxieux, ici encore, nous démontrons que la perte des neurones DAergiques et 5-HTergiques compromet l'efficacité de la L-Dopa dans la normalisation de l'activité électrique des neurones de la BLA.

Nos données fournissent des preuves *in vivo* du rôle de la dopamine dans la modulation de la fréquence des neurones du BLA dans le contexte de la maladie de Parkinson. Nous montrons aussi que le rétablissement de la transmission DAergique restaure la réponse anormale de l'amygdale lorsque la neurotransmission en 5-HT n'est pas affectée. En outre, en l'absence de neurones 5-HTergiques, la L-dopa n'est pas convertie en DA et donc compromet les réponses des neurones de la BLA. Ce phénomène est responsable de l'absence d'efficacité de la L-Dopa sur le comportement anxieux.

3) Habénula latérale

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la dépression dans le contexte de la maladie de Parkinson, nous avons examiné si l'activité électrique des neurones de l'habénula latérale (LHb) peut être influencée par la lésion des systèmes monoaminergiques et également par l'administration de la dose thérapeutique de la L-Dopa. La LHb est impliquée dans le contrôle du comportement de motivation. Sur la base de ses relations importantes avec les systèmes monoaminergiques, la LHb agit comme un noyau relais central pour former un réseau complexe et coordonné pour la régulation des comportements moteurs importants et pour le traitement de l'émotion et de l'information de motivation codée (Hikosaka, 2010; Klemm 2004 ; Geisler et Trimble, 2008; Bianco & Wilson, 2009). Dans le cadre de la maladie de Parkinson, une étude comportementale et d'imagerie chez les rats 6-OHDA suggérait un lien direct entre la carence en dopamine, la connectivité du raphé, et les comportements de dépression, tous connectés via la LHb. La dégénérescence des cellules DAergiques dans la SNc est donc susceptible de causer l'hyperactivité dans la partie interne du globus pallidus (GPi) et les neurones de la LHb, qui à son tour régule la baisse de l'excitabilité du raphé et de sa connectivité, conduisant ainsi à la dépression (Sourani et al., 2012). Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas trouvé d'importants changements dans la fréquence et le mode de

décharge des neurones de la LHb, à l'exception d'une tendance à la diminution de la fréquence chez les rats avec des lésions combinées des trois systèmes monoaminergiques. L'absence de changements significatifs peut être expliqué par le fait que les projections afférentes de la LHb proviennent à la fois du GPi, hyperactif et du striatum, hypoactif chez les malades parkinsoniens.

Il a été suggéré que la DA peut moduler l'activité des neurones de la LHb (Phillipson et Pycock, 1982). En effet, la stimulation des neurones DAergiques du mésencéphale augmente la fréquence des neurones de la LHb chez le rat (Shen et al., 2012; Kowski et al., 2009). Ces résultats sont cohérents avec les nôtres montrant que la L-Dopa a augmenté la fréquence de décharge des neurones chez les rats lésés. Ces changements apparaissent en parallèle avec l'amélioration du comportement de type dépressif induit par la L-Dopa chez les animaux lésés. En revanche, bien que la L-Dopa augmente l'activité électrique des neurones de la LHb, elle n'a eu aucune incidence sur les autres troubles de l'humeur, notamment le manque de motivation qui est dépendant de la 5-HT selon nos résultats. La LHb module l'activité électrique des neurones 5-HT dans le RD (Zhao et al., 2014; Wang et Aghajanian, 1977). Les traitements avec des antidépresseurs qui favorisent l'activité 5-HTergique ont été montrés comme bénéfiques sur les troubles de l'humeur, par l'augmentation du niveau extracellulaire de DA et également de 5-HT (Damsa et al., 2004).

Nos données fournissent des preuves *in vivo* du rôle de la DA dans la modulation de l'activité des neurones de la LHb dans le cadre de la maladie de Parkinson étant donné que la restauration de la DA par le traitement à la L-dopa a augmenté la réponse des neurones LHb qui illustre l'efficacité de la L-Dopa sur le comportement de type dépressif.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Nos deux modèles, de déplétions ou de lésions, ont permis d'étudier l'impact des monoamines sur différents troubles retrouvés chez les patients Parkinsoniens, ainsi que l'impact de ces déplétions monoaminergiques sur l'efficacité des traitements antiparkinsoniens et leur rôle dans les circuits neuronaux impliqués.

Notre étude met en évidence l'importance des monoamines dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Nous avons montré l'implication de la DA dans les troubles moteurs mais également non moteurs. En effet, la lésion DAergique est à l'origine des troubles locomoteurs et de la marche mais également de l'anxiété, des troubles dépressifs et de l'anhédonie. Cependant, nous avons aussi mis en lumière l'importance de la NA et de la 5-HT dans les troubles parkinsoniens. En effet, bien que les troubles moteurs soient en grande partie régis par la déplétion DAergique, la lésion des neurones NAergiques du LC et 5-HTergiques du RD est impliquée dans l'akinésie et la bradykinésie chez nos rats 6-OHDA. Nos données ajoutent la preuve que la maladie de Parkinson doit être modélisée comme une pathologie monoaminergique.

De plus, nous avons mis en évidence le rôle de la NA et de la 5-HT dans les phénomènes de dépression grâce à notre premier modèle de déplétion étant donné que l'ajout des déplétions NAergiques et 5-HTergiques aggravait le trouble dépressif. L'importance de la 5-HT dans ce trouble a été confirmée par notre second modèle de lésion neuronale lorsque l'ajout de la lésion des neurones 5-HTergiques était à l'origine de l'apparition d'un manque de motivation chez le rat illustrant l'apathie retrouvée chez les patients.

Nous avons également mis en évidence l'importance de ces monoamines dans la thérapie de la maladie en étudiant le traitement médicamenteux (L-Dopa) et chirurgical (SCP du NST). La L-Dopa qui améliore les déficits anxieux, perd son efficacité lors de l'ajout de la lésion 5-HTergique, alors qu'elle reste bénéfique sur le trouble dépressif chez les rats avec la lésion combinée des trois monoamines. D'autre part, elle n'a aucune incidence sur l'anhédonie ou l'apathie. Ces résultats confirment l'origine DAergiques des troubles anxieux et dépressifs mais surtout met en lumière l'importance des trois monoamines sur l'efficacité de la L-Dopa ainsi que la complexité physiopathologique des troubles de l'humeur dans la maladie de Parkinson ce qui peut expliquer la difficulté à traiter ces symptômes. Enfin, nous fournissons la première preuve que la déplétion combinée des monoamines modifie l'efficacité de la SCP du NST sur les troubles moteurs et anxieux, mais pas sur le comportement "dit dépressif". Ici encore, nous observons l'importance des monoamines dans l'efficacité de la SCP du NST ainsi que la complexité du comportement "dit-dépressif".

Afin de mieux comprendre la physiopathologie et la thérapie des troubles moteurs, anxieux et dépressifs dans le contexte de la maladie de Parkinson, nous avons étudié l'impact des déplétions monoaminergiques sur les systèmes neuronaux impliqués. Nos données mettent en évidence le lien étroit entre l'activité neuronale du NST et les symptômes moteurs de la maladie comme le changement du mode de décharge évolue en parallèle avec la manifestation des symptômes moteurs globaux mais également des troubles moteurs plus fins. Nos données fournissent également des preuves *in vivo* du rôle de la DA dans la modulation de l'activité de la BLA et de la LHb dans le contexte de la maladie de Parkinson puisque la restauration de la transmission DAergique par le traitement à la L-dopa a augmenté la réponse des neurones de la BLA et de la LHb. Nous avons également mis en évidence la relation entre les troubles non moteurs et l'activité des deux structures associées car la L-Dopa influence l'activité

neuronale de la BLA et de la LHB illustrant l'efficacité de la L-Dopa sur le comportement anxieux et dépressif, respectivement.

A présent, il serait intéressant d'affiner le lien qu'il existe entre les différentes structures limbiques et le comportement dans le contexte de la maladie de Parkinson. Pour cela, il serait intéressant de réaliser une étude corrélative mettant en jeu nos rats avec les différentes lésions monoaminergiques dans des tests d'anxiété et de dépression en enregistrant en "freely moving" l'activité neuronale des structures limbiques impliquées. En effet, le système limbique étant complexe et mettant en jeu des structures impliquées dans les émotions, il serait intéressant de mettre en parallèle les modifications neuronales avec les troubles non moteurs ainsi que l'influence des traitements en temps réel.

Nos modèles selon les déplétions ou lésions utilisées illustrent donc un modèle plus ou moins avancé de la maladie qui permet d'étudier les troubles moteurs et psychiatriques de la maladie ainsi que l'efficacité des traitements à des temps donnés. Cependant, il serait intéressant d'étudier un modèle progressif de la maladie se rapprochant des processus dégénératifs chez le patient, d'une part par son côté évolutif et d'autre part par la présence des corps de Lewy qui sont deux caractéristiques que nous ne reproduisons pas avec nos modèles. Les symptômes non moteurs sont encore peu pris en charge alors qu'ils peuvent apparaître avant les symptômes moteurs. L'enjeu étant d'étudier l'origine physiopathologique de ces troubles non moteurs afin de pouvoir *in fine* développer de nouvelles approches thérapeutiques mieux adaptées, la mise au point de modèles animaux qui reproduisent l'évolution de la manifestation des déficits moteurs et non moteurs de la maladie de Parkinson semble essentiel. La surproduction en α -synucléine représente une alternative efficace au modèle classique de la maladie de Parkinson chez le rat (Kirik et al., 2002). Entraîner sa surproduction au niveau de la SNc chez le rat conduit à une dégénérescence progressive des

neurones DAergiques (Koprach et al., 2010) et à la formation d'amas protéiques similaires aux corps de Lewy dans les neurones qui résistent à la dégénérescence (Decressac et al., 2012b). Il a été montré que ce modèle permet de mieux étudier l'évolution des comportements moteurs chez les rats par rapport aux autres modèles classiquement utilisés (Decressac et al., 2012a et 2012b). Cependant, à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée aux comportements non moteurs des animaux rendus parkinsoniens à l'aide de l' α -synucléine. Nous pourrions alors entraîner sa surproduction également au niveau du LC et du RD afin d'obtenir un modèle similaire au notre mais avec le développement des corps de Lewy et permettant une lésion progressive des systèmes monoaminergiques.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Aarsland, D., Pahlhagen, S., Ballard, C.G., Ehrt, U. & Svenningsson, P. (2012) Depression in Parkinson disease--epidemiology, mechanisms and management. *Nature reviews. Neurology*, **8**, 35-47.
- Ackroff, K. & Sclafani, A. (2003) Flavor preferences conditioned by intragastric ethanol with limited access training. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **75**, 223-233.
- Afsharpour, S. (1985) Topographical projections of the cerebral cortex to the subthalamic nucleus. *The Journal of comparative neurology*, **236**, 14-28.
- Agid, Y. (1991) Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet*, **337**, 1321-1324.
- Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, **12**, 366-375.
- Alexander, G.E. & Crutcher, M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences*, **13**, 266-271.
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D. & DeLong, M.R. (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Progress in brain research*, **85**, 119-146.
- Alheid, G.F. (2003) Extended amygdala and basal forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **985**, 185-205.
- Aman, T.K., Shen, R.Y. & Haj-Dahmane, S. (2007) D2-like dopamine receptors depolarize dorsal raphe serotonin neurons through the activation of nonselective cationic conductance. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **320**, 376-385.
- Amat, J., Matus-Amat, P., Watkins, L.R. & Maier, S.F. (1998) Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain research*, **812**, 113-120.
- Andrade, T.G., Macedo, C.E., Zangrossi, H., Jr. & Graeff, F.G. (2004) Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behavioural brain research*, **153**, 55-60.
- Apaydin, H., Ahlskog, J.E., Parisi, J.E., Boeve, B.F. & Dickson, D.W. (2002) Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response. *Archives of neurology*, **59**, 102-112.
- Araki, M., McGeer, P.L. & McGeer, E.G. (1984) Retrograde HRP tracing combined with a pharmacohistochemical method for GABA transaminase for the identification of presumptive GABAergic projections to the habenula. *Brain research*, **304**, 271-277.
- Arcos D, S.A., Nuñez A, Flores G, Aceves J, Arias-Montaña JA. (2003) Noradrenaline increases the firing rate of a subpopulation of rat subthalamic neurones through the activation of alpha 1-adrenoceptors. *Neuropharmacology*.

- Asan, E., Steinke, M. & Lesch, K.P. (2013) Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety. *Histochemistry and cell biology*, **139**, 785-813.
- Assogna, F., Cravello, L., Caltagirone, C. & Spalletta, G. (2011) Anhedonia in Parkinson's disease: a systematic review of the literature. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **26**, 1825-1834.
- Aston-Jones, G., Chiang, C. & Alexinsky, T. (1991) Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Progress in brain research*, **88**, 501-520.
- Aston-Jones, G., Zhu, Y. & Card, J.P. (2004) Numerous GABAergic afferents to locus ceruleus in the pericerulear dendritic zone: possible interneuronal pool. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 2313-2321.
- Aziz, T.Z., Peggs, D., Sambrook, M.A. & Crossman, A.R. (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **6**, 288-292.

B

- Baloyannis, S.J., Costa, V. & Baloyannis, I.S. (2006) Morphological alterations of the synapses in the locus coeruleus in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, **248**, 35-41.
- Barone, P., Scarzella, L., Marconi, R., Antonini, A., Morgante, L., Bracco, F., Zappia, M., Musch, B. & Depression/Parkinson Italian Study, G. (2006) Pramipexole versus sertraline in the treatment of depression in Parkinson's disease: a national multicenter parallel-group randomized study. *Journal of neurology*, **253**, 601-607.
- Barrot, M., Sesack, S.R., Georges, F., Pistis, M., Hong, S. & Jhou, T.C. (2012) Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 14094-14101.
- Bastide, M.F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C.E., Fernagut, P.O. & Bezard, E. (2014) Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to l-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiology of disease*, **62**, 179-192.
- Baufreton, J., Zhu, Z.T., Garret, M., Bioulac, B., Johnson, S.W. & Taupignon, A.I. (2005) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**, 1771-1777.
- Bauman, M.D. & Amaral, D.G. (2005) The distribution of serotonergic fibers in the macaque monkey amygdala: an immunohistochemical study using antisera to 5-hydroxytryptamine. *Neuroscience*, **136**, 193-203.

- Beckstead, R.M. (1983) A pallidostriatal projection in the cat and monkey. *Brain research bulletin*, **11**, 629-632.
- Beckstead, R.M., Domesick, V.B. & Nauta, W.J. (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain research*, **175**, 191-217.
- Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B. & Benazzouz, A. (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 9595-9606.
- Bejjani, B.P., Damier, P., Arnulf, I., Thivard, L., Bonnet, A.M., Dormont, D., Cornu, P., Pidoux, B., Samson, Y. & Agid, Y. (1999) Transient acute depression induced by high-frequency deep-brain stimulation. *The New England journal of medicine*, **340**, 1476-1480.
- Benabid, A.L., Koudsie, A., Benazzouz, A., Fraix, V., Ashraf, A., Le Bas, J.F., Chabardes, S. & Pollak, P. (2000) Subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Archives of medical research*, **31**, 282-289.
- Benabid, A.L., Pollak, P., Gervason, C., Hoffmann, D., Gao, D.M., Hommel, M., Perret, J.E. & de Rougemont, J. (1991) Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet*, **337**, 403-406.
- Benabid, A.L., Pollak, P., Gross, C., Hoffmann, D., Benazzouz, A., Gao, D.M., Laurent, A., Gentil, M. & Perret, J. (1994) Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotactic and functional neurosurgery*, **62**, 76-84.
- Benabid, A.L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S. & de Rougemont, J. (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Applied neurophysiology*, **50**, 344-346.
- Benarroch, E.E. (2009) The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology*, **73**, 1699-1704.
- Benazzouz, A., Breit, S., Koudsie, A., Pollak, P., Krack, P. & Benabid, A.L. (2002) Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **17 Suppl 3**, S145-149.
- Benazzouz, A., Boraud, T., Feger, J., Burbaud, P., Bioulac, B. & Gross, C. (1996) Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **11**, 627-632.
- Benazzouz, A., Gross, C., Feger, J., Boraud, T. & Bioulac, B. (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *The European journal of neuroscience*, **5**, 382-389.
- Benito-Leon, J., Cubo, E., Coronell, C. & Group, A.S. (2012) Impact of apathy on health-related quality of life in recently diagnosed Parkinson's disease: the ANIMO study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **27**, 211-218.

- Berendsen, H.H. & Broekkamp, C.L. (1990) Behavioural evidence for functional interactions between 5-HT-receptor subtypes in rats and mice. *British journal of pharmacology*, **101**, 667-673.
- Bergman, H., Wichmann, T. & DeLong, M.R. (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, **249**, 1436-1438.
- Bernard, R. & Veh, R.W. (2012) Individual neurons in the rat lateral habenular complex project mostly to the dopaminergic ventral tegmental area or to the serotonergic raphe nuclei. *The Journal of comparative neurology*, **520**, 2545-2558.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. & Seitelberger, F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the neurological sciences*, **20**, 415-455.
- Bianco, I.H. & Wilson, S.W. (2009) The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **364**, 1005-1020.
- Birkmayer, J.G. & Birkmayer, W. (1987) Improvement of disability and akinesia of patients with Parkinson's disease by intravenous iron substitution. *Annals of clinical and laboratory science*, **17**, 32-35.
- Birkmayer, W. & Riederer, P. (1986) Biological aspects of depression in Parkinson's disease. *Psychopathology*, **19 Suppl 2**, 58-61.
- Blandini, F., Joseph, S.A. & Tassorelli, C. (1997) Systemic administration of ephedrine induces Fos protein expression in caudate putamen and subthalamic nucleus of rats. *Functional neurology*, **12**, 293-296.
- Blin, O., Ferrandez, A.M. & Serratrice, G. (1990) Quantitative analysis of gait in Parkinson patients: increased variability of stride length. *Journal of the neurological sciences*, **98**, 91-97.
- Blomstedt, P., Hariz, M.I., Lees, A., Silberstein, P., Limousin, P., Yelnik, J. & Agid, Y. (2008) Acute severe depression induced by intraoperative stimulation of the substantia nigra: a case report. *Parkinsonism & related disorders*, **14**, 253-256.
- Bolam, J.P. & Smith, Y. (1990) The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain research*, **529**, 57-78.
- Bolam, J.P. & Smith, Y. (1992) The striatum and the globus pallidus send convergent synaptic inputs onto single cells in the entopeduncular nucleus of the rat: a double anterograde labelling study combined with postembedding immunocytochemistry for GABA. *The Journal of comparative neurology*, **321**, 456-476.
- Boll, S., Gamer, M., Kalisch, R. & Buchel, C. (2011) Processing of facial expressions and their significance for the observer in subregions of the human amygdala. *NeuroImage*, **56**, 299-306.
- Boraud, T., Bezard, E., Guehl, D., Bioulac, B. & Gross, C. (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain research*, **787**, 157-160.

- Bouali-Benazzouz, R., Tai, C.H., Chetrit, J. & Benazzouz, A. (2009) Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus. *Neuroscience*, **164**, 588-596.
- Bourin, M., Petit-Demouliere, B., Dhonnchadha, B.N. & Hascoet, M. (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, **21**, 567-574.
- Boyajian, C.L., Loughlin, S.E. & Leslie, F.M. (1987) Anatomical evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **241**, 1079-1091.
- Braak, H. & Del Tredici, K. (2008) Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. *Experimental neurology*, **212**, 226-229.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N. & Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, **24**, 197-211.
- Bronstein, J.M., Tagliati, M., Alterman, R.L., Lozano, A.M., Volkmann, J., Stefani, A., Horak, F.B., Okun, M.S., Foote, K.D., Krack, P., Pahwa, R., Henderson, J.M., Hariz, M.I., Bakay, R.A., Rezai, A., Marks, W.J., Jr., Moro, E., Vitek, J.L., Weaver, F.M., Gross, R.E. & DeLong, M.R. (2011) Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Archives of neurology*, **68**, 165.
- Brown, E.E. & Fibiger, H.C. (1993) Differential effects of excitotoxic lesions of the amygdala on cocaine-induced conditioned locomotion and conditioned place preference. *Psychopharmacology*, **113**, 123-130.
- Brown, R.G., Landau, S., Hindle, J.V., Playfer, J., Samuel, M., Wilson, K.C., Hurt, C.S., Anderson, R.J., Carnell, J., Dickinson, L., Gibson, G., van Schaick, R., Sellwood, K., Thomas, B.A., Burn, D.J. & Group, P.-P.S. (2011) Depression and anxiety related subtypes in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **82**, 803-809.
- Bubar, M.J. & Cunningham, K.A. (2008) Prospects for serotonin 5-HT_{2R} pharmacotherapy in psychostimulant abuse. *Progress in brain research*, **172**, 319-346.
- Bubar, M.J., McMahon, L.R., De Deurwaerdere, P., Spampinato, U. & Cunningham, K.A. (2003) Selective serotonin reuptake inhibitors enhance cocaine-induced locomotor activity and dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, **44**, 342-353.
- Burbaud, P., Gross, C., Benazzouz, A., Coussemaque, M. & Bioulac, B. (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Experimental brain research*, **105**, 48-58.
- Burkhardt, J.M., Constantinidis, C., Anstrom, K.K., Roberts, D.C. & Woodward, D.J. (2007) Synchronous oscillations and phase reorganization in the basal ganglia during akinesia

induced by high-dose haloperidol. *The European journal of neuroscience*, **26**, 1912-1924.

Burn, D.J. (2002) Depression in Parkinson's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **9 Suppl 3**, 44-54.

C

Caldecott-Hazard, S., Mazziotta, J. & Phelps, M. (1988) Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **8**, 1951-1961.

Campbell, M.C., Black, K.J., Weaver, P.M., Lugar, H.M., Videen, T.O., Tabbal, S.D., Karimi, M., Perlmutter, J.S. & Hershey, T. (2012) Mood response to deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, **24**, 28-36.

Canteras, N.S., Shammah-Lagnado, S.J., Silva, B.A. & Ricardo, J.A. (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain research*, **513**, 43-59.

Cao, C., Temel, Y., Blokland, A., Ozen, H., Steinbusch, H.W., Vlamings, R., Nguyen, H.P., von Horsten, S., Schmitz, C. & Visser-Vandewalle, V. (2006) Progressive deterioration of reaction time performance and choreiform symptoms in a new Huntington's disease transgenic ratmodel. *Behavioural brain research*, **170**, 257-261.

Carobrez, A.P. & Bertoglio, L.J. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **29**, 1193-1205.

Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D. & Bjorklund, A. (2007) Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 1819-1833.

Castrioto, A., Lozano, A.M., Poon, Y.Y., Lang, A.E., Fallis, M. & Moro, E. (2011) Ten-year outcome of subthalamic stimulation in Parkinson disease: a blinded evaluation. *Archives of neurology*, **68**, 1550-1556.

Cenci, M.A. & Lundblad, M. (2006) Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry*, **99**, 381-392.

Chase, T.N., Ng, L.K. & Watanabe, A.M. (1972) Parkinson's disease. Modification by 5-hydroxytryptophan. *Neurology*, **22**, 479-484.

Chaudhuri, K.R. & Schapira, A.H. (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet. Neurology*, **8**, 464-474.

Chaudhuri, K.R. & Odin, P. (2010) The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Progress in brain research*, **184**, 325-341.

- Chen, L., Liu, J., Zhang, Q.J., Feng, J.J., Gui, Z.H., Ali, U., Wang, Y., Fan, L.L., Hou, C. & Wang, T. (2011) Alterations of emotion, cognition and firing activity of the basolateral nucleus of the amygdala after partial bilateral lesions of the nigrostriatal pathway in rats. *Brain research bulletin*, **85**, 329-338.
- Cherington, M. (1970) Parkinsonism, L-dopa and mental depression. *Journal of the American Geriatrics Society*, **18**, 513-516.
- Chetrit, J., Ballion, B., Laquitaine, S., Belujon, P., Morin, S., Taupignon, A., Bioulac, B., Gross, C.E. & Benazzouz, A. (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PloS one*, **4**, e6208.
- Chinaglia, G., Landwehrmeyer, B., Probst, A. & Palacios, J.M. (1993) Serotonergic terminal transporters are differentially affected in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: an autoradiographic study with [3H]citalopram. *Neuroscience*, **54**, 691-699.
- Chan-Palay, V. & Asan, E. (1989) Quantitation of catecholamine neurons in the locus coeruleus in human brains of normal young and older adults and in depression. *The Journal of comparative neurology*, **287**, 357-372.
- Christianson, J.P., Ragole, T., Amat, J., Greenwood, B.N., Strong, P.V., Paul, E.D., Fleshner, M., Watkins, L.R. & Maier, S.F. (2010) 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. *Biological psychiatry*, **67**, 339-345.
- Christoph, G.R., Leonzio, R.J. & Wilcox, K.S. (1986) Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **6**, 613-619.
- Chung, H.J., Steinberg, J.P., Huganir, R.L. & Linden, D.J. (2003) Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science*, **300**, 1751-1755.
- Colpaert, F.C. (1987) Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology*, **26**, 1431-1440.
- Cools, R. (2006) Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **30**, 1-23.
- Cools, R., Calder, A.J., Lawrence, A.D., Clark, L., Bullmore, E. & Robbins, T.W. (2005) Individual differences in threat sensitivity predict serotonergic modulation of amygdala response to fearful faces. *Psychopharmacology*, **180**, 670-679.
- Cotzias, G.C. (1968) L-Dopa for Parkinsonism. *The New England journal of medicine*, **278**, 630.
- Crossman, A.R., Sambrook, M.A. & Jackson, A. (1984) Experimental hemichorea/hemiballismus in the monkey. Studies on the intracerebral site of action in a drug-induced dyskinesia. *Brain : a journal of neurology*, **107** (Pt 2), 579-596.

- Cryan, J.F., Page, M.E. & Lucki, I. (2002) Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *European journal of pharmacology*, **436**, 197-205.
- Czernecki, V., Pillon, B., Houeto, J.L., Welter, M.L., Mesnage, V., Agid, Y. & Dubois, B. (2005) Does bilateral stimulation of the subthalamic nucleus aggravate apathy in Parkinson's disease? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **76**, 775-779.
- Czernecki, V., Schupbach, M., Yaici, S., Levy, R., Bardinet, E., Yelnik, J., Dubois, B. & Agid, Y. (2008) Apathy following subthalamic stimulation in Parkinson disease: a dopamine responsive symptom. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **23**, 964-969.

D

- Damsa, C., Bumb, A., Bianchi-Demicheli, F., Vidailhet, P., Sterck, R., Andreoli, A. & Beyenburg, S. (2004) "Dopamine-dependent" side effects of selective serotonin reuptake inhibitors: a clinical review. *The Journal of clinical psychiatry*, **65**, 1064-1068.
- Davis, M. (1998) Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biological psychiatry*, **44**, 1239-1247.
- Davis, M., Rainnie, D. & Cassell, M. (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in neurosciences*, **17**, 208-214.
- De Deurwaerdere, P. & Chesselet, M.F. (2000) Nigrostriatal lesions alter oral dyskinesia and c-Fos expression induced by the serotonin agonist 1-(m-chlorophenyl)piperazine in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 5170-5178.
- Del Tredici, K., Rub, U., De Vos, R.A., Bohl, J.R. & Braak, H. (2002) Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **61**, 413-426.
- De Simoni, M.G., Dal Toso, G., Fodritto, F., Sokola, A. & Algeri, S. (1987) Modulation of striatal dopamine metabolism by the activity of dorsal raphe serotonergic afferences. *Brain research*, **411**, 81-88.
- Decressac, M., Mattsson, B. & Bjorklund, A. (2012a) Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and alpha-synuclein rat models of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, **235**, 306-315.
- Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P. & Bjorklund, A. (2012b) Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiology of disease*, **45**, 939-953.
- Degos, B., Deniau, J.M., Le Cam, J., Mailly, P. & Maurice, N. (2008) Evidence for a direct subthalamo-cortical loop circuit in the rat. *The European journal of neuroscience*, **27**, 2599-2610.

- Delaville, C., Chetrit, J., Abdallah, K., Morin, S., Carroit, L., De Deurwaerdere, P. & Benazzouz, A. (2012a) Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiology of disease*, **45**, 763-773.
- Delaville, C., Deurwaerdere, P.D. & Benazzouz, A. (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Frontiers in systems neuroscience*, **5**, 31.
- Delaville, C., Navailles, S. & Benazzouz, A. (2012b) Effects of noradrenaline and serotonin depletions on the neuronal activity of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata in experimental parkinsonism. *Neuroscience*, **202**, 424-433.
- Delwaide, P.J., Sabbatino, M. & Delwaide, C. (1986) Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *Journal of neural transmission. Supplementum*, **22**, 129-139.
- Descarries, L., Audet, M.A., Doucet, G., Garcia, S., Oleskevich, S., Seguela, P., Soghomonian, J.J. & Watkins, K.C. (1990) Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationships. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **600**, 81-92.
- Devos, D., Defebvre, L. & Bordet, R. (2010) Dopaminergic and non-dopaminergic pharmacological hypotheses for gait disorders in Parkinson's disease. *Fundamental & clinical pharmacology*, **24**, 407-421.
- Devos, D., Labyt, E., Derambure, P., Bourriez, J.L., Cassim, F., Guieu, J.D., Destee, A. & Defebvre, L. (2003) Effect of L-Dopa on the pattern of movement-related (de)synchronisation in advanced Parkinson's disease. *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology*, **33**, 203-212.
- Di Matteo, V., Pierucci, M., Esposito, E., Crescimanno, G., Benigno, A. & Di Giovanni, G. (2008) Serotonin modulation of the basal ganglia circuitry: therapeutic implication for Parkinson's disease and other motor disorders. *Progress in brain research*, **172**, 423-463.
- Doshi, P.K., Chhaya, N. & Bhatt, M.H. (2002) Depression leading to attempted suicide after bilateral subthalamic nucleus stimulation for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **17**, 1084-1085.
- Dowd, E. & Dunnett, S.B. (2004) Deficits in a lateralized associative learning task in dopamine-depleted rats with functional recovery by dopamine-rich transplants. *The European journal of neuroscience*, **20**, 1953-1959.
- Dowd, E. & Dunnett, S.B. (2005) Comparison of 6-hydroxydopamine-induced medial forebrain bundle and nigrostriatal terminal lesions in a lateralised nose-poking task in rats. *Behavioural brain research*, **159**, 153-161.
- Dray, A. (1981) Serotonin in the basal ganglia: functions and interactions with other neuronal pathways. *Journal de physiologie*, **77**, 393-403.
- Dremencov, E., El Mansari, M. & Blier, P. (2007) Distinct electrophysiological effects of paliperidone and risperidone on the firing activity of rat serotonin and norepinephrine neurons. *Psychopharmacology*, **194**, 63-72.

- Drui, G., Carnicella, S., Carcenac, C., Favier, M., Bertrand, A., Boulet, S. & Savasta, M. (2014) Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Molecular psychiatry*, **19**, 358-367.
- Dutton, A. & Dyball, R.E. (1979) Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *The Journal of physiology*, **290**, 433-440.

E

- Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr*, **38**, 1236-1239.
- Eisenstein, S.A., Dewispelaere, W.B., Campbell, M.C., Lugar, H.M., Perlmutter, J.S., Black, K.J. & Hershey, T. (2014) Acute changes in mood induced by subthalamic deep brain stimulation in Parkinson disease are modulated by psychiatric diagnosis. *Brain stimulation*, **7**, 701-708.
- Elam, M., Clark, D. & Svensson, T.H. (1986) Electrophysiological effects of the enantiomers of 3-PPP on neurons in the locus coeruleus of the rat. *Neuropharmacology*, **25**, 1003-1008.
- Ellison, G. (1994) Stimulant-induced psychosis, the dopamine theory of schizophrenia, and the habenula. *Brain research. Brain research reviews*, **19**, 223-239.
- Etkin, A., Klemenhagen, K.C., Dudman, J.T., Rogan, M.T., Hen, R., Kandel, E.R. & Hirsch, J. (2004) Individual differences in trait anxiety predict the response of the basolateral amygdala to unconsciously processed fearful faces. *Neuron*, **44**, 1043-1055.
- Eskow Jaunarajs, K.L., Angoa-Perez, M., Kuhn, D.M. & Bishop, C. (2011) Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of l-DOPA treatment. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **35**, 556-564.
- Eskow Jaunarajs, K.L., Dupre, K.B., Ostock, C.Y., Button, T., Deak, T. & Bishop, C. (2010) Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on nonmotor sequelae in the hemiparkinsonian rat. *Behavioural pharmacology*, **21**, 627-637.

F

- Fallon, J.H., Koziell, D.A. & Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *The Journal of comparative neurology*, **180**, 509-532.
- Fasano, A., Romito, L.M., Daniele, A., Piano, C., Zinno, M., Bentivoglio, A.R. & Albanese, A. (2010) Motor and cognitive outcome in patients with Parkinson's disease 8 years after subthalamic implants. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 2664-2676.
- Felix-Ortiz, A.C., Beyeler, A., Seo, C., Leppa, C.A., Wildes, C.P. & Tye, K.M. (2013) BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*, **79**, 658-664.

- Felix-Ortiz, A.C. & Tye, K.M. (2014) Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **34**, 586-595.
- Fetoni, V., Soliveri, P., Monza, D., Testa, D. & Girotti, F. (1999) Affective symptoms in multiple system atrophy and Parkinson's disease: response to levodopa therapy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **66**, 541-544.
- File, S.E. (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural brain research*, **125**, 151-157.
- Fleury, V., Cousin, E., Czernecki, V., Schmitt, E., Lhomme, E., Poncet, A., Fraix, V., Tropres, I., Pollak, P., Krainik, A. & Krack, P. (2014) Dopaminergic modulation of emotional conflict in Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, **6**, 164.
- Fonnum, F., Grofava, I. & Rinvik, E. (1978) Origin and distribution of glutamate decarboxylase in the nucleus subthalamicus of the cat. *Brain research*, **153**, 370-374.
- Fornai, F., Giorgi, F.S., Gesi, M., Chen, K., Alessri, M.G. & Shih, J.C. (2001) Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-4 and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse*, **39**, 213-221.
- Fox, S.H., Visanji, N.P., Johnston, T.H., Gomez-Ramirez, J., Voon, V. & Brotchie, J.M. (2006) Dopamine receptor agonists and levodopa and inducing psychosis-like behavior in the MPTP primate model of Parkinson disease. *Archives of neurology*, **63**, 1343-1344.
- Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H. & Cenci, M.A. (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **42**, 327-340.
- Friedenberg, D.L. & Cummings, J.L. (1989) Parkinson's disease, depression, and the on-off phenomenon. *Psychosomatics*, **30**, 94-99.
- Funkiewiez, A., Ardouin, C., Caputo, E., Krack, P., Fraix, V., Klinger, H., Chabardes, S., Foote, K., Benabid, A.L. & Pollak, P. (2004) Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood, and behaviour in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **75**, 834-839.
- Funkiewiez, A., Ardouin, C., Cools, R., Krack, P., Fraix, V., Batir, A., Chabardes, S., Benabid, A.L., Robbins, T.W. & Pollak, P. (2006) Effects of levodopa and subthalamic nucleus stimulation on cognitive and affective functioning in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **21**, 1656-1662.

G

- Geisler, S. & Trimble, M. (2008) The lateral habenula: no longer neglected. *CNS spectrums*, **13**, 484-489.

- Garcia-Cairasco, N., Miguel, E.C., Rauch, S.L. & Leckman, J.F. (1997) Current controversies and future directions in basal ganglia research. Integrating basic neuroscience and clinical investigation. *The Psychiatric clinics of North America*, **20**, 945-962.
- Gean, P.W. & Chang, F.C. (1992) Pharmacological characterization of excitatory synaptic potentials in rat basolateral amygdaloid neurons. *Synapse*, **11**, 1-9.
- Geisler, S., Andres, K.H. & Veh, R.W. (2003) Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *The Journal of comparative neurology*, **458**, 78-97.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr. & Sibley, D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, **250**, 1429-1432.
- Gonon, F.G. (1988) Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience*, **24**, 19-28.
- Gottesfeld, Z. (1983) Origin and distribution of noradrenergic innervation in the habenula: a neurochemical study. *Brain research*, **275**, 299-304.
- German, D.C., Manaye, K.F., White, C.L., 3rd, Woodward, D.J., McIntire, D.D., Smith, W.K., Kalaria, R.N. & Mann, D.M. (1992) Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Annals of neurology*, **32**, 667-676.
- Graeff, F.G. (2002) On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, **163**, 467-476.
- Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W. & Kimura, M. (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, **265**, 1826-1831.
- Grenhoff, J., Nisell, M., Ferre, S., Aston-Jones, G. & Svensson, T.H. (1993) Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *Journal of neural transmission. General section*, **93**, 11-25.
- Grenhoff, J. & Svensson, T.H. (1993) Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *European journal of pharmacology*, **233**, 79-84.
- Groenewegen, H.J. & Berendse, H.W. (1990) Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **294**, 607-622.
- Guiard, B.P., El Mansari, M., Merali, Z. & Blier, P. (2008) Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol*, **11**, 625-639.
- Guigoni, C., Li, Q., Aubert, I., Dovero, S., Bioulac, B.H., Bloch, B., Crossman, A.R., Gross, C.E. & Bezard, E. (2005) Involvement of sensorimotor, limbic, and associative basal ganglia domains in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 2102-2107.

Guridi, J. & Obeso, J.A. (2001) The subthalamic nucleus, hemiballismus and Parkinson's disease: reappraisal of a neurosurgical dogma. *Brain : a journal of neurology*, **124**, 5-19.

H, I, J

Haapaniemi, T.H., Pursiainen, V., Korpelainen, J.T., Huikuri, H.V., Sotaniemi, K.A. & Myllyla, V.V. (2001) Ambulatory ECG and analysis of heart rate variability in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **70**, 305-310.

Haddjeri, N., de Montigny, C. & Blier, P. (1997) Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *British journal of pharmacology*, **120**, 865-875.

Haj-Dahmane, S. (2001) D2-like dopamine receptor activation excites rat dorsal raphe 5-HT neurons in vitro. *The European journal of neuroscience*, **14**, 125-134.

Hajos-Korcsok, E., McTavish, S.F. & Sharp, T. (2000) Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine. *European journal of pharmacology*, **407**, 101-107.

Halberstadt, A.L. & Balaban, C.D. (2006) Serotonergic and nonserotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus send collateralized projections to both the vestibular nuclei and the central amygdaloid nucleus. *Neuroscience*, **140**, 1067-1077.

Halliday, G.M., Blumbergs, P.C., Cotton, R.G., Blessing, W.W. & Geffen, L.B. (1990) Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain research*, **510**, 104-107.

Hammond, C. & Yelnik, J. (1983) Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization. *Neuroscience*, **8**, 781-790.

Hassani, O.K., Francois, C., Yelnik, J. & Feger, J. (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain research*, **749**, 88-94.

Hazrati, L.N., Pinault, D. & Parent, A. (1995) The thalamic reticular nucleus does not send commissural projection to the contralateral parafascicular nucleus in the rat. *Brain research*, **679**, 123-134.

Hensler, J.G. (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **30**, 203-214.

Heuer, A., Smith, G.A., Lelos, M.J., Lane, E.L. & Dunnett, S.B. (2012) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behavioural brain research*, **228**, 30-43.

- Hikosaka, O. (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature reviews. Neuroscience*, **11**, 503-513.
- Hill, M.P. & Brochie, J.M. (1999) The adrenergic receptor agonist, clonidine, potentiates the anti-parkinsonian action of the selective kappa-opioid receptor agonist, enadoline, in the monoamine-depleted rat. *British journal of pharmacology*, **128**, 1577-1585.
- Hnasko, T.S., Hjelmstad, G.O., Fields, H.L. & Edwards, R.H. (2012) Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 15076-15085.
- Hodos, W. (1961) Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science*, **134**, 943-944.
- Hoehn, M.M. & Yahr, M.D. (2001) Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology*, **57**, S11-26.
- Hornung, J.P. (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of chemical neuroanatomy*, **26**, 331-343.
- Hornykiewicz, O. (1975) Brain monoamines and Parkinsonism. *Psychopharmacology bulletin*, **11**, 34-35.
- Houeto, J.L., Mesnage, V., Mallet, L., Pillon, B., Gargiulo, M., du Moncel, S.T., Bonnet, A.M., Pidoux, B., Dormont, D., Cornu, P. & Agid, Y. (2002) Behavioural disorders, Parkinson's disease and subthalamic stimulation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **72**, 701-707.
- Hurtig, H.I., Trojanowski, J.Q., Galvin, J., Ewbank, D., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Clark, C.M., Glosser, G., Stern, M.B., Gollomp, S.M. & Arnold, S.E. (2000) Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology*, **54**, 1916-1921.
- Iqbal, N. & van Praag, H.M. (1995) The role of serotonin in schizophrenia. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **5 Suppl**, 11-23.
- Isella, V., Iurlaro, S., Piolti, R., Ferrarese, C., Frattola, L., Appollonio, I., Melzi, P. & Grimaldi, M. (2003) Physical anhedonia in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **74**, 1308-1311.
- Jacobs, B.L. & Azmitia, E.C. (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews*, **72**, 165-229.
- Ji, H. & Shepard, P.D. (2007) Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 6923-6930.
- Juraska, J.M., Wilson, C.J. & Groves, P.M. (1977) The substantia nigra of the rat: a Golgi study. *The Journal of comparative neurology*, **172**, 585-600.

K

- Kalen, P., Skagerberg, G. & Lindvall, O. (1988) Projections from the ventral tegmental area and mesencephalic raphe to the dorsal raphe nucleus in the rat. Evidence for a minor dopaminergic component. *Experimental brain research*, **73**, 69-77.
- Kalin, N.H., Shelton, S.E. & Davidson, R.J. (2004) The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 5506-5515.
- Kapur, S. & Remington, G. (1996) Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *The American journal of psychiatry*, **153**, 466-476.
- Kaneoke, Y. & Vitek, J.L. (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *Journal of neuroscience methods*, **68**, 211-223.
- Kano, O., Ikeda, K., Cridebring, D., Takazawa, T., Yoshii, Y. & Iwasaki, Y. (2011) Neurobiology of depression and anxiety in Parkinson's disease. *Parkinson's disease*, **2011**, 143547.
- Kawahara, H., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M. & Tanaka, M. (1993) Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience letters*, **162**, 81-84.
- Kemoun, G. & Defebvre, L. (2001) [Gait disorders in Parkinson disease. Clinical description, analysis of posture, initiation of stabilized gait]. *Presse medicale*, **30**, 452-459.
- Kerenyi, L., Ricaurte, G.A., Schretlen, D.J., McCann, U., Varga, J., Mathews, W.B., Ravert, H.T., Dannals, R.F., Hilton, J., Wong, D.F. & Szabo, Z. (2003) Positron emission tomography of striatal serotonin transporters in Parkinson disease. *Archives of neurology*, **60**, 1223-1229.
- Khoshbouei, H., Cecchi, M., Dove, S., Javors, M. & Morilak, D.A. (2002) Behavioral reactivity to stress: amplification of stress-induced noradrenergic activation elicits a galanin-mediated anxiolytic effect in central amygdala. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **71**, 407-417.
- Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T.E., Muzyczka, N., Mandel, R.J. & Bjorklund, A. (2002) Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 2780-2791.
- Kirsch-Darrow, L., Fernandez, H.H., Marsiske, M., Okun, M.S. & Bowers, D. (2006) Dissociating apathy and depression in Parkinson disease. *Neurology*, **67**, 33-38.
- Kim, D.O., Yang, X.M. & Ye, Y. (2003) A subpopulation of dorsal raphe nucleus neurons retrogradely labeled with cholera toxin-B injected into the inner ear. *Experimental brain research*, **153**, 514-521.
- Kish, S.J. (2003) Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Advances in neurology*, **91**, 39-49.
- Kita, H. & Kitai, S.T. (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *The Journal of comparative neurology*, **260**, 435-452.

- Kitai, S.T. & Deniau, J.M. (1981) Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain research*, **214**, 411-415.
- Klemm, W.R. (2004) Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, **10**, RA261-273.
- Klinkenberg, I. & Blokland, A. (2011) A comparison of scopolamine and biperiden as a rodent model for cholinergic cognitive impairment. *Psychopharmacology*, **215**, 549-566.
- Kobayashi, R.M., Palkovits, M., Kopin, I.J. & Jacobowitz, D.M. (1974) Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus. *Brain research*, **77**, 269-279.
- Koprich, J.B., Johnston, T.H., Reyes, M.G., Sun, X. & Brotchie, J.M. (2010) Expression of human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*, **5**, 43.
- Kowski, A.B., Geisler, S., Krauss, M. & Veh, R.W. (2008) Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. *The Journal of comparative neurology*, **507**, 1465-1478.
- Kowski, A.B., Veh, R.W. & Weiss, T. (2009) Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience*, **161**, 1154-1165.
- Krack, P., Batir, A., Van Blercom, N., Chabardes, S., Fraix, V., Ardouin, C., Koudsie, A., Limousin, P.D., Benazzouz, A., LeBas, J.F., Benabid, A.L. & Pollak, P. (2003) Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*, **349**, 1925-1934.
- Krack, P. & Hariz, M.I. (2010) Parkinson disease: deep brain stimulation in Parkinson disease-what went wrong? *Nature reviews. Neurology*, **6**, 535-536.
- Krack, P., Hariz, M.I., Baunez, C., Guridi, J. & Obeso, J.A. (2010) Deep brain stimulation: from neurology to psychiatry? *Trends in neurosciences*, **33**, 474-484.

L

- Labarre D, Meissner W, Boraud T (2008) Measure of the regularity of events in stochastic point processes, application to neuron activity analysis. In: 33rd IEEE International Conference on Acoustics, pp 489-492. Las Vegas, NV.
- Lalumiere, R.T. (2014) Optogenetic dissection of amygdala functioning. *Frontiers in behavioral neuroscience*, **8**, 107.
- Lauterbach, E.C., Freeman, A. & Vogel, R.L. (2003) Correlates of generalized anxiety and panic attacks in dystonia and Parkinson disease. *Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology*, **16**, 225-233.

- Lecourtier, L. & Kelly, P.H. (2007) A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **31**, 658-672.
- LeDoux, J. (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and molecular neurobiology*, **23**, 727-738.
- Leenders, K.L., Salmon, E.P., Tyrrell, P., Perani, D., Brooks, D.J., Sager, H., Jones, T., Marsden, C.D. & Frackowiak, R.S. (1990) The nigrostriatal dopaminergic system assessed in vivo by positron emission tomography in healthy volunteer subjects and patients with Parkinson's disease. *Archives of neurology*, **47**, 1290-1298.
- Lemke, M.R. (2008) Depressive symptoms in Parkinson's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **15 Suppl 1**, 21-25.
- Levens, S.M., Devinsky, O. & Phelps, E.A. (2011) Role of the left amygdala and right orbital frontal cortex in emotional interference resolution facilitation in working memory. *Neuropsychologia*, **49**, 3201-3212.
- Levy, R. & Czernecki, V. (2006) Apathy and the basal ganglia. *Journal of neurology*, **253 Suppl 7**, VII54-61.
- Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C.D., Schulz, D., Henn, F. & Malinow, R. (2011) Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature*, **470**, 535-539.
- Li, K., Zhou, T., Liao, L., Yang, Z., Wong, C., Henn, F., Malinow, R., Yates, J.R., 3rd & Hu, H. (2013) betaCaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression. *Science*, **341**, 1016-1020.
- Li, Y., Du, X.F., Liu, C.S., Wen, Z.L. & Du, J.L. (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental cell*, **23**, 1189-1202.
- Limousin, P., Krack, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Ardouin, C., Hoffmann, D. & Benabid, A.L. (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*, **339**, 1105-1111.
- Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Broussolle, E., Perret, J.E. & Benabid, A.L. (1995) Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **10**, 672-674.
- Lindgren, H.S., Demirbugen, M., Bergqvist, F., Lane, E.L. & Dunnett, S.B. (2014) The effect of additional noradrenergic and serotonergic depletion on a lateralised choice reaction time task in rats with nigral 6-OHDA lesions. *Experimental neurology*, **253**, 52-62.
- Linner, L., Endersz, H., Ohman, D., Bengtsson, F., Schalling, M. & Svensson, T.H. (2001) Reboxetine modulates the firing pattern of dopamine cells in the ventral tegmental area and selectively increases dopamine availability in the prefrontal cortex. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **297**, 540-546.

- Lisman, J.E. (1997) Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends in neurosciences*, **20**, 38-43.
- Lisoprawski, A., Herve, D., Blanc, G., Glowinski, J. & Tassin, J.P. (1980) Selective activation of the mesocortico-frontal dopaminergic neurons induced by lesion of the habenula in the rat. *Brain research*, **183**, 229-234.
- Loas, G., Fremaux, D., Gayant, C. & Boyer, P. (1995) Anhedonia, depression, and suicidal ideation. *Perceptual and motor skills*, **80**, 978.
- Loughlin, S.E. & Fallon, J.H. (1982) Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally. *Neuroscience letters*, **32**, 11-16.
- Lowry, C.A., Johnson, P.L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J. & Shekhar, A. (2005) Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress*, **8**, 233-246.
- Lucas, G., De Deurwaerdere, P., Caccia, S. & Umberto, S. (2000) The effect of serotonergic agents on haloperidol-induced striatal dopamine release in vivo: opposite role of 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor subtypes and significance of the haloperidol dose used. *Neuropharmacology*, **39**, 1053-1063.
- Lucas, G. & Spampinato, U. (2000) Role of striatal serotonin2A and serotonin2C receptor subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum. *Journal of neurochemistry*, **74**, 693-701.

M, N, O

- Ma, Q.P., Yin, G.F., Ai, M.K. & Han, J.S. (1991) Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neuroscience letters*, **134**, 21-24.
- Mahanty, N.K. & Sah, P. (1998) Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature*, **394**, 683-687.
- Mann, D.M. (1983) The locus coeruleus and its possible role in ageing and degenerative disease of the human central nervous system. *Mechanisms of ageing and development*, **23**, 73-94.
- Maricle, R.A., Nutt, J.G., Valentine, R.J. & Carter, J.H. (1995) Dose-response relationship of levodopa with mood and anxiety in fluctuating Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*, **45**, 1757-1760.
- Marie, R.M., Rioux, P., Eustache, F., Travers, J.M., Lechevalier, B. & Baron, J.C. (1995) Clues about the functional neuroanatomy of verbal working memory: a study of resting brain glucose metabolism in Parkinson's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **2**, 83-94.
- Marsh, G.G. & Markham, C.H. (1973) Does levodopa alter depression and psychopathology in Parkinsonism patients? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **36**, 925-935.

- Marsh, L., Williams, J.R., Rocco, M., Grill, S., Munro, C. & Dawson, T.M. (2004) Psychiatric comorbidities in patients with Parkinson disease and psychosis. *Neurology*, **63**, 293-300.
- Matsui, K., Tachibana, H., Yamanishi, T., Oguru, M., Toda, K., Okuda, B. & Oka, N. (2013) Clinical correlates of anhedonia in patients with Parkinson's disease. *Clinical neurology and neurosurgery*, **115**, 2524-2527.
- Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*, **447**, 1111-1115.
- McDonald, A.J. (1982) Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **212**, 293-312.
- McDonald, A.J. (1992) Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain research bulletin*, **28**, 179-185.
- McNamara, P., Durso, R. & Harris, E. (2006) Life goals of patients with Parkinson's disease: A pilot study on correlations with mood and cognitive functions. *Clinical rehabilitation*, **20**, 818-826.
- Meltzer, H.Y. & Huang, M. (2008) In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Progress in brain research*, **172**, 177-197.
- Menard, J. & Treit, D. (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **23**, 591-613.
- Mignon, L. & Wolf, W.A. (2002) Postsynaptic 5-HT(1A) receptors mediate an increase in locomotor activity in the monoamine-depleted rat. *Psychopharmacology*, **163**, 85-94.
- Mink, J.W. & Thach, W.T. (1991) Basal ganglia motor control. III. Pallidal ablation: normal reaction time, muscle cocontraction, and slow movement. *Journal of neurophysiology*, **65**, 330-351.
- Mintz, I., Hammond, C., Guibert, B. & Leviel, V. (1986) Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra. *Brain research*, **376**, 406-408.
- Mitra, R., Ferguson, D. & Sapolsky, R.M. (2009) Mineralocorticoid receptor overexpression in basolateral amygdala reduces corticosterone secretion and anxiety. *Biological psychiatry*, **66**, 686-690.
- Miyawaki, E., Meah, Y. & Koller, W.C. (1997) Serotonin, dopamine, and motor effects in Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology*, **20**, 300-310.
- Moreau, C., Cantiniaux, S., Delval, A., Defebvre, L. & Azulay, J.P. (2010) [Gait disorders in Parkinson's disease: and pathophysiological approaches]. *Revue neurologique*, **166**, 158-167.
- Moro, E. & Albanese, A. (1999) Apomorphine and levodopa challenge in patients with a focal midbrain lesion. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **14**, 269-275.

- Morris, J.S., Smith, K.A., Cowen, P.J., Friston, K.J. & Dolan, R.J. (1999) Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion. *NeuroImage*, **10**, 163-172.
- Morris, M.E., Iansek, R., Matyas, T.A. & Summers, J.J. (1994) The pathogenesis of gait hypokinesia in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*, **117** (Pt 5), 1169-1181.
- Narabayashi, H., Yokochi, F., Ogawa, T. & Igakura, T. (1991) [Analysis of L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine effect on motor and psychological symptoms in Parkinson's disease]. *No to shinkei = Brain and nerve*, **43**, 263-268.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C. & De Deurwaerdere, P. (2010) Chronic L-DOPA therapy alters central serotonergic function and L-DOPA-induced dopamine release in a region-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **41**, 585-590.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C. & De Deurwaerdere, P. (2010b) Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, **38**, 136-143.
- Nestler, E.J., Gould, E., Manji, H., Buncan, M., Duman, R.S., Greshenfeld, H.K., Hen, R., Koester, S., Lederhendler, I., Meaney, M., Robbins, T., Winsky, L. & Zalcman, S. (2002) Preclinical models: status of basic research in depression. *Biological psychiatry*, **52**, 503-528.
- Ni, Z.G., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D.M., Benabid, A.L. & Benazzouz, A. (2001) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain research*, **899**, 142-147.
- Nicholson, S.L. & Brotchie, J.M. (2002) 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) and Parkinson's disease - opportunities for novel therapeutics to reduce the problems of levodopa therapy. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **9 Suppl 3**, 1-6.
- Norbury, R., Taylor, M.J., Selvaraj, S., Murphy, S.E., Harmer, C.J. & Cowen, P.J. (2009) Short-term antidepressant treatment modulates amygdala response to happy faces. *Psychopharmacology*, **206**, 197-204.
- Oertel, W.H. & Mugnaini, E. (1984) Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neuroscience letters*, **47**, 233-238.
- Olanow, C.W. & Brin, M.F. (2001) Surgical therapies for Parkinson's disease. A physician's perspective. *Advances in neurology*, **86**, 421-433.
- Olanow, C.W. & Kordower, J.H. (2009) Modeling Parkinson's disease. *Annals of neurology*, **66**, 432-436.
- Omelchenko, N., Bell, R. & Sesack, S.R. (2009) Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience*, **30**, 1239-1250.

P

- Paille, V., Henry, V., Lescaudron, L., Brachet, P. & Damier, P. (2007) Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **22**, 533-539.
- Pare, D. & Gaudreau, H. (1996) Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 3334-3350.
- Parent, A., Gravel, S. & Boucher, R. (1981) The origin of forebrain afferents to the habenula in rat, cat and monkey. *Brain research bulletin*, **6**, 23-38.
- Park, M.R. (1987) Monosynaptic inhibitory postsynaptic potentials from lateral habenula recorded in dorsal raphe neurons. *Brain research bulletin*, **19**, 581-586.
- Paulus, W. & Jellinger, K. (1991) The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **50**, 743-755.
- Pavese, N., Rivero-Bosch, M., Lewis, S.J., Whone, A.L. & Brooks, D.J. (2011) Progression of monoaminergic dysfunction in Parkinson's disease: a longitudinal 18F-dopa PET study. *NeuroImage*, **56**, 1463-1468.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1996) The Rat Brain in Stereotatic Coordinates. *Academic Press, San Diego*.
- Phelps, E.A. & LeDoux, J.E. (2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, **48**, 175-187.
- Phillipson, O.T. & Pycock, C.J. (1982) Dopamine neurones of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula. Some implications for habenular function. *Experimental brain research*, **45**, 89-94.
- Pifl, C., Schingnitz, G. & Hornykiewicz, O. (1991) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience*, **44**, 591-605.
- Politis, M. & Niccolini, F. (2014) Serotonin in Parkinson's disease. *Behavioural brain research*.
- Pollak, P., Benabid, A.L., Limousin, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Le Bas, J.F. & Perret, J. (1996) Subthalamic nucleus stimulation alleviates akinesia and rigidity in parkinsonian patients. *Advances in neurology*, **69**, 591-594.
- Ponzio, F., Hallman, H. & Jonsson, G. (1981) Noradrenaline and dopamine interaction in rat brain during development. *Medical biology*, **59**, 161-169.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, **266**, 730-732.

R

- Rahman, M.M., Uddin, M.J., Chowdhury, J.H. & Chowdhury, T.I. (2014) Effect of levodopa and carbidopa on non-motor symptoms and signs of Parkinson's disease. *Mymensingh medical journal : MMJ*, **23**, 18-23.
- Rainnie, D.G. (1999) Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *Journal of neurophysiology*, **82**, 69-85.
- Rainnie, D.G., Asprodini, E.K. & Shinnick-Gallagher, P. (1991) Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *Journal of neurophysiology*, **66**, 986-998.
- Rajakumar, N., Elisevich, K. & Flumerfelt, B.A. (1993) Compartmental origin of the striato-entopeduncular projection in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **331**, 286-296.
- Rauch, S.L., Shin, L.M. & Wright, C.I. (2003) Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **985**, 389-410.
- Reader, T.A., Briere, R., Grondin, L. & Ferron, A. (1986) Effects of p-chlorophenylalanine on cortical monoamines and on the activity of noradrenergic neurons. *Neurochemical research*, **11**, 1025-1035.
- Reijnders, J.S., Ehrt, U., Weber, W.E., Aarsland, D. & Leentjens, A.F. (2008) A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **23**, 183-189; quiz 313.
- Richard, I.H. (2005) Anxiety disorders in Parkinson's disease. *Advances in neurology*, **96**, 42-55.
- Richard, I.H., Kurlan, R., Tanner, C., Factor, S., Hubble, J., Suchowersky, O. & Waters, C. (1997) Serotonin syndrome and the combined use of deprenyl and an antidepressant in Parkinson's disease. Parkinson Study Group. *Neurology*, **48**, 1070-1077.
- Riekkinen, M., Kejonen, K., Jakala, P., Soininen, H. & Riekkinen, P., Jr. (1998) Reduction of noradrenaline impairs attention and dopamine depletion slows responses in Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience*, **10**, 1429-1435.
- Ringendahl, H. & Sierla, T. (1997) [Freezing phenomenon in Parkinson disease]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, **65**, 435-445.
- Rommelfanger, K.S. & Wichmann, T. (2010) Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*, **4**, 139.
- Rueter, L.E. & Jacobs, B.L. (1996) Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. *Neuroreport*, **7**, 1107-1111.
- Rylander, D., Iderberg, H., Li, Q., Dekundy, A., Zhang, J., Li, H., Baishen, R., Danysz, W., Bezard, E. & Cenci, M.A. (2010) A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys. *Neurobiology of disease*, **39**, 352-361.

S

- Sajdyk, T.J. & Shekhar, A. (1997) Excitatory amino acid receptors in the basolateral amygdala regulate anxiety responses in the social interaction test. *Brain research*, **764**, 262-264.
- Sakai, K. & Gash, D.M. (1994) Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain research*, **633**, 144-150.
- Salin, P., Manrique, C., Forni, C. & Kerkerian-Le Goff, L. (2002) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus selectively reverses dopamine denervation-induced cellular defects in the output structures of the basal ganglia in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 5137-5148.
- Sanders, S.K. & Shekhar, A. (1995) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **52**, 701-706.
- Sandyk, R. (1996) Freezing of gait in Parkinson's disease is improved by treatment with weak electromagnetic fields. *The International journal of neuroscience*, **85**, 111-124.
- Saper, C.B., Sorrentino, D.M., German, D.C. & de Lacalle, S. (1991) Medullary catecholaminergic neurons in the normal human brain and in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, **29**, 577-584.
- Sartorius, A., Kiening, K.L., Kirsch, P., von Gall, C.C., Haberkorn, U., Unterberg, A.W., Henn, F.A. & Meyer-Lindenberg, A. (2010) Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biological psychiatry*, **67**, e9-e11.
- Savasta, M., Dubois, A. & Scatton, B. (1986) Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. *Brain research*, **375**, 291-301.
- Sawada, M., Kanamori, T., Hayakawa, T. & Nagatsu, T. (1985) Changes in activities of tryptophan hydroxylase and cyclic AMP-dependent and calcium-calmodulin-dependent protein kinases in raphe serotonergic neurons of 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Neurochemistry international*, **7**, 761-763.
- Scatton, B., Javoy-Agid, F., Rouquier, L., Dubois, B. & Agid, Y. (1983) Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain research*, **275**, 321-328.
- Schneider, F., Habel, U., Volkmann, J., Regel, S., Kornischka, J., Sturm, V. & Freund, H.J. (2003) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus enhances emotional processing in Parkinson disease. *Archives of general psychiatry*, **60**, 296-302.
- Scholtissen, B., Verhey, F.R., Steinbusch, H.W. & Leentjens, A.F. (2006) Serotonergic mechanisms in Parkinson's disease: opposing results from preclinical and clinical data. *Journal of neural transmission*, **113**, 59-73.
- Scibilia, R.J., Lachowicz, J.E. & Kilts, C.D. (1992) Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse*, **11**, 146-154.

- Shabel, S.J., Proulx, C.D., Trias, A., Murphy, R.T. & Malinow, R. (2012) Input to the lateral habenula from the basal ganglia is excitatory, aversive, and suppressed by serotonin. *Neuron*, **74**, 475-481.
- Shen, X., Ruan, X. & Zhao, H. (2012) Stimulation of midbrain dopaminergic structures modifies firing rates of rat lateral habenula neurons. *PloS one*, **7**, e34323.
- Shepard, P.D., Holcomb, H.H. & Gold, J.M. (2006) Schizophrenia in translation: the presence of absence: habenular regulation of dopamine neurons and the encoding of negative outcomes. *Schizophrenia bulletin*, **32**, 417-421.
- Shin, L.M. & Liberzon, I. (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **35**, 169-191.
- Shin, E., Rogers, J.T., Devoto, P., Bjorklund, A. & Carta, M. (2014) Noradrenaline neuron degeneration contributes to motor impairments and development of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, **257**, 25-38.
- Shumake, J., Edwards, E. & Gonzalez-Lima, F. (2003) Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. *Brain research*, **963**, 274-281.
- Simon, A.B. & Gorman, J.M. (2006) Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **3**, 57-68.
- Slattery, D.A., Markou, A. & Cryan, J.F. (2007) Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology*, **190**, 555-568.
- Smith, B.N. & Dudek, F.E. (1996) Amino acid-mediated regulation of spontaneous synaptic activity patterns in the rat basolateral amygdala. *Journal of neurophysiology*, **76**, 1958-1967.
- Smith, H.R. & Porrino, L.J. (2008) The comparative distributions of the monoamine transporters in the rodent, monkey, and human amygdala. *Brain structure & function*, **213**, 73-91.
- Smith, W.M., Vidaillet, H.J., Jr., Worley, S.J., Pollard, J.K., German, L.D., Mortara, D.W. & Ideker, R.E. (2000) Signal averaging in Wolff-Parkinson-White syndrome: evidence that fractionated activation is not necessary for body surface high-frequency potentials. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*, **23**, 1330-1335.
- Smith, Y. & Kieval, J.Z. (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, **23**, S28-33.
- Smith, Y. & Parent, A. (1988) Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity. *Brain research*, **453**, 353-356.
- Smith, Y., Parent, A., Seguela, P. & Descarries, L. (1987) Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *The Journal of comparative neurology*, **259**, 50-64.

- Smith, Y., Shink, E. & Sidibe, M. (1998) Neuronal circuitry and synaptic connectivity of the basal ganglia. *Neurosurgery clinics of North America*, **9**, 203-222.
- Smith, Y. & Villalba, R. (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **23 Suppl 3**, S534-547.
- Smith, G.A., Heuer, A., Dunnett, S.B. & Lane, E.L. (2012) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting l-DOPA-induced dyskinesia. *Behavioural brain research*, **226**, 281-292.
- Snaith, R.P. (1993) Identifying depression: the significance of anhedonia. *Hospital practice*, **28**, 55-60.
- Sockeel, P., Dujardin, K., Devos, D., Deneve, C., Destee, A. & Defebvre, L. (2006) The Lille apathy rating scale (LARS), a new instrument for detecting and quantifying apathy: validation in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **77**, 579-584.
- Sourani, D., Eitan, R., Gordon, N. & Goelman, G. (2012) The habenula couples the dopaminergic and the serotonergic systems: application to depression in Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience*, **36**, 2822-2829.
- Srinivasan, J. & Schmidt, W.J. (2003) Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *The European journal of neuroscience*, **17**, 2586-2592.
- Stacy, M.A., Murck, H. & Kroenke, K. (2010) Responsiveness of motor and nonmotor symptoms of Parkinson disease to dopaminergic therapy. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **34**, 57-61.
- Steeves, T.D. & Fox, S.H. (2008) Neurobiological basis of serotonin-dopamine antagonists in the treatment of Gilles de la Tourette syndrome. *Progress in brain research*, **172**, 495-513.
- Steinbusch, H.W. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, **6**, 557-618.
- Storch, A., Schneider, C.B., Wolz, M., Sturwald, Y., Nebe, A., Odin, P., Mahler, A., Fuchs, G., Jost, W.H., Chaudhuri, K.R., Koch, R., Reichmann, H. & Ebersbach, G. (2013) Nonmotor fluctuations in Parkinson disease: severity and correlation with motor complications. *Neurology*, **80**, 800-809.
- Surdhar, I., Gee, M., Bouchard, T., Coupland, N., Malykhin, N. & Camicioli, R. (2012) Intact limbic-prefrontal connections and reduced amygdala volumes in Parkinson's disease with mild depressive symptoms. *Parkinsonism & related disorders*, **18**, 809-813.

T, U

- Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C. & Takahashi, R.N. (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **156**, 830-840.
- Tai, C.H., Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B., Gross, C. & Benazzouz, A. (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridges neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**, 1820-1830.
- Tan, S.K., Hartung, H., Schievink, S., Sharp, T. & Temel, Y. (2013) High-frequency stimulation of the substantia nigra induces serotonin-dependent depression-like behavior in animal models. *Biological psychiatry*, **73**, e1-3.
- Tanaka, T., Yokoo, H., Mizoguchi, K., Yoshida, M., Tsuda, A. & Tanaka, M. (1991) Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. *Brain research*, **544**, 174-176.
- Taquet, H., Javoy-Agid, F., Cesselin, F., Hamon, M., Legrand, J.C. & Agid, Y. (1982) Microtopography of methionine-enkephalin, dopamine and noradrenaline in the ventral mesencephalon of human control and Parkinsonian brains. *Brain research*, **235**, 303-314.
- Taylor, A.E. & Saint-Cyr, J.A. (1990) Depression in Parkinson's disease: reconciling physiological and psychological perspectives. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, **2**, 92-98.
- Temel, Y., Blokland, A., Steinbusch, H.W. & Visser-Vandewalle, V. (2005) The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Progress in neurobiology*, **76**, 393-413.
- Temel, Y., Boothman, L.J., Blokland, A., Magill, P.J., Steinbusch, H.W., Visser-Vandewalle, V. & Sharp, T. (2007) Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 17087-17092.
- Temel, Y., Kessels, A., Tan, S., Topdag, A., Boon, P. & Visser-Vandewalle, V. (2006) Behavioural changes after bilateral subthalamic stimulation in advanced Parkinson disease: a systematic review. *Parkinsonism & related disorders*, **12**, 265-272.
- Tessitore, A., Hariri, A.R., Fera, F., Smith, W.G., Chase, T.N., Hyde, T.M., Weinberger, D.R. & Mattay, V.S. (2002) Dopamine modulates the response of the human amygdala: a study in Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 9099-9103.
- Thobois, S., Ardouin, C., Lhomme, E., Klinger, H., Lagrange, C., Xie, J., Fraix, V., Coelho Braga, M.C., Hassani, R., Kistner, A., Juphard, A., Seigneuret, E., Chabardes, S., Mertens, P., Polo, G., Reilhac, A., Costes, N., LeBars, D., Savasta, M., Tremblay, L., Quesada, J.L., Bosson, J.L., Benabid, A.L., Broussolle, E., Pollak, P. & Krack, P.

- (2010) Non-motor dopamine withdrawal syndrome after surgery for Parkinson's disease: predictors and underlying mesolimbic denervation. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 1111-1127.
- Thobois, S. & Remy, P. (2008) [Is SPECT of interest in parkinsonian syndromes?]. *Revue neurologique*, **164 Spec No 1**, F17-25.
- Tommasi, G., Lanotte, M., Albert, U., Zibetti, M., Castelli, L., Maina, G. & Lopiano, L. (2008) Transient acute depressive state induced by subthalamic region stimulation. *Journal of the neurological sciences*, **273**, 135-138.
- Toyoda, H., Li, X.Y., Wu, L.J., Zhao, M.G., Descalzi, G., Chen, T., Koga, K. & Zhuo, M. (2011) Interplay of amygdala and cingulate plasticity in emotional fear. *Neural plasticity*, **2011**, 813749.
- Treadway, M.T. & Zald, D.H. (2011) Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **35**, 537-555.
- Truitt, W.A., Johnson, P.L., Dietrich, A.D., Fitz, S.D. & Shekhar, A. (2009) Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. *Neuroscience*, **160**, 284-294.
- Tye, K.M., Prakash, R., Kim, S.Y., Fenno, L.E., Grosenick, L., Zarabi, H., Thompson, K.R., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C. & Deisseroth, K. (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, **471**, 358-362.
- Uekermann, J., Daum, I., Peters, S., Wiebel, B., Przuntek, H. & Muller, T. (2003) Depressed mood and executive dysfunction in early Parkinson's disease. *Acta neurologica Scandinavica*, **107**, 341-348.

V,W,X,Y,Z

- van der Kooy, D. & Hattori, T. (1980) Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat. *Brain research*, **186**, 1-7.
- van Kerkhof, L.W., Damsteegt, R., Trezza, V., Voorn, P. & Vanderschuren, L.J. (2013) Functional integrity of the habenula is necessary for social play behaviour in rats. *The European journal of neuroscience*, **38**, 3465-3475.
- van Stegeren, A.H., Wolf, O.T., Everaerd, W. & Rombouts, S.A. (2008) Interaction of endogenous cortisol and noradrenaline in the human amygdala. *Progress in brain research*, **167**, 263-268.
- Vertes, R.P., Fortin, W.J. & Crane, A.M. (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **407**, 555-582.
- Vertes, R.P. & Martin, G.F. (1988) Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **275**, 511-541.

- Vingerhoets, F.J., Villemure, J.G., Temperli, P., Pollo, C., Pralong, E. & Ghika, J. (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology*, **58**, 396-401.
- Vizueta, N., Patrick, C.J., Jiang, Y., Thomas, K.M. & He, S. (2012) Dispositional fear, negative affectivity, and neuroimaging response to visually suppressed emotional faces. *NeuroImage*, **59**, 761-771.
- Volkman, J., Albanese, A., Kulisevsky, J., Tornqvist, A.L., Houeto, J.L., Pidoux, B., Bonnet, A.M., Mendes, A., Benabid, A.L., Fraix, V., Van Blercom, N., Xie, J., Obeso, J., Rodriguez-Oroz, M.C., Guridi, J., Schnitzler, A., Timmermann, L., Gironell, A.A., Molet, J., Pascual-Sedano, B., Rehnacrona, S., Moro, E., Lang, A.C., Lozano, A.M., Bentivoglio, A.R., Scerrati, M., Contarino, M.F., Romito, L., Janssens, M. & Agid, Y. (2009) Long-term effects of pallidal or subthalamic deep brain stimulation on quality of life in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **24**, 1154-1161.
- Voon, V., Krack, P., Lang, A.E., Lozano, A.M., Dujardin, K., Schupbach, M., D'Ambrosia, J., Thobois, S., Tamma, F., Herzog, J., Speelman, J.D., Samanta, J., Kubu, C., Rossignol, H., Poon, Y.Y., Saint-Cyr, J.A., Ardouin, C. & Moro, E. (2008) A multicentre study on suicide outcomes following subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*, **131**, 2720-2728.
- von Bohlen und Halbach, O., Schober, A., Hertel, R. & Unsicker, K. (2005) MPTP treatment impairs tyrosine hydroxylase immunopositive fibers not only in the striatum, but also in the amygdala. *Neuro-degenerative diseases*, **2**, 44-48.
- Waldmeier, P.C. & Delini-Stula, A.A. (1979) Serotonin--dopamine interactions in the nigrostriatal system. *European journal of pharmacology*, **55**, 363-373.
- Waldmeier, P.C., Feldtrauer, J.J., Kam, R. & Stocklin, K. (1979) Effects of baclofen on striatal 5-HT mediated by the nigrostriatal dopamine system. *European journal of pharmacology*, **54**, 279-287.
- Wallman, M.J., Gagnon, D. & Parent, M. (2011) Serotonin innervation of human basal ganglia. *The European journal of neuroscience*, **33**, 1519-1532.
- Wang, R.Y. & Aghajanian, G.K. (1977) Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science*, **197**, 89-91.
- Wang, D.V., Wang, F., Liu, J., Zhang, L., Wang, Z. & Lin, L. (2011) Neurons in the amygdala with response-selectivity for anxiety in two ethologically based tests. *PLoS one*, **6**, e18739.
- Weintraub, D., Mavandadi, S., Mamikonyan, E., Siderowf, A.D., Duda, J.E., Hurtig, H.I., Colcher, A., Horn, S.S., Nazem, S., Ten Have, T.R. & Stern, M.B. (2010) Atomoxetine for depression and other neuropsychiatric symptoms in Parkinson disease. *Neurology*, **75**, 448-455.
- Westin, J.E., Janssen, M.L., Sager, T.N. & Temel, Y. (2012) Automated gait analysis in bilateral parkinsonian rats and the role of L-DOPA therapy. *Behavioural brain research*, **226**, 519-528.

- Whittier, J.R. & Mettler, F.A. (1947) Subthalamic lesion in the primate. *Federation proceedings*, **6**, 226.
- Whittier, J.R. & Mettler, F.A. (1949) Studies on the subthalamus of the rhesus monkey; hyperkinesia and other physiologic effects of subthalamic lesions; with special reference to the subthalamic nucleus of Luys. *The Journal of comparative neurology*, **90**, 319-372.
- Wilbur, R., Kulik, F.A. & Kulik, A.V. (1988) Noradrenergic effects in tardive dyskinesia, akathisia and pseudoparkinsonism via the limbic system and basal ganglia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **12**, 849-864.
- Wingerson, D.K., Cowley, D.S., Kramer, G.L., Petty, F. & Roy-Byrne, P.P. (1996) Effect of benzodiazepines on plasma levels of homovanillic acid in anxious patients and control subjects. *Psychiatry research*, **65**, 53-59.
- Winter, C., von Rumohr, A., Mundt, A., Petrus, D., Klein, J., Lee, T., Morgenstern, R., Kupsch, A. & Juckel, G. (2007) Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behavioural brain research*, **184**, 133-141.
- Wilbur, R., Kulik, F.A. & Kulik, A.V. (1988) Noradrenergic effects in tardive dyskinesia, akathisia and pseudoparkinsonism via the limbic system and basal ganglia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **12**, 849-864.
- Wunderlich, G.R., Raymond, R., DeSousa, N.J., Nobrega, J.N. & Vaccarino, F.J. (2002) Decreased CCK(B) receptor binding in rat amygdala in animals demonstrating greater anxiety-like behavior. *Psychopharmacology*, **164**, 193-199.
- Yahr, M.D., Duvoisin, R.C., Schear, M.J., Barrett, R.E. & Hoehn, M.M. (1969) Treatment of parkinsonism with levodopa. *Archives of neurology*, **21**, 343-354.
- Zanoveli, J.M., Carvalho, M.C., Cunha, J.M. & Brandao, M.L. (2009) Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: an in vivo microdialysis study. *Brain research*, **1294**, 106-115.
- Zarow, C., Lyness, S.A., Mortimer, J.A. & Chui, H.C. (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Archives of neurology*, **60**, 337-341.
- Zeef, D.H., Vlamings, R., Lim, L.W., Tan, S., Janssen, M.L., Jahanshahi, A., Hoogland, G., Prickaerts, J., Steinbusch, H.W. & Temel, Y. (2012) Motor and non-motor behaviour in experimental Huntington's disease. *Behavioural brain research*, **226**, 435-439.
- Zhao, H., Zhang, B.L., Yang, S.J. & Rusak, B. (2014) The role of lateral habenula-dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness. *Behavioural brain research*.
- Zhou, R., Wang, S. & Zhu, X. (2010) Prenatal ethanol exposure attenuates GABAergic inhibition in basolateral amygdala leading to neuronal hyperexcitability and anxiety-like behavior of adult rat offspring. *Neuroscience*, **170**, 749-757.

Annexe

Characterization of a Non Linear Fractional Model of Electrode-Tissue Impedance for Neuronal Stimulation

F. Kölbl*, J. Sabatier*, G. N’Kaoua*, F. Naudet†, E. Faggiani†, A. Benazzouz†, S. Renaud* and N. Lewis*

*IMS, UMR 5218 CNRS - University of Bordeaux

351, Cours de la Libération 33405 TALENCE - FRANCE,

Email: florian.kolbl@ims-bordeaux.fr

†IMN, UMR 5293 CNRS - University of Bordeaux

Email: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr

Abstract—The design of neuro-stimulators must include a realistic model of electrode-tissue interface. Complex electrochemical phenomena associated to high levels of stimulation current give fractional and non linear behavior to this interface that simple linearized models fail to fit. This paper describes both a measurement protocol based on biphasic current-controlled solicitations and a modeling procedure relying on an original approach of multi-model, taking into account the non-linear and fractional effects. This model fits correctly the measurement results with current levels varying from $50\mu A$ to $1mA$. Furthermore the whole characterization protocol can be safely transposed to *in vivo* measurements.

I. ELECTRODE/TISSUE ELECTRICAL MODELING FOR NEURONAL INTERFACE SYSTEMS

Neuro-electronic systems are based on electrical interaction with neuronal tissue through electrodes. Such an interface allows both recording and stimulating cells. A large variety of extra-cellular electrodes have been developed for *in vivo* or *in vitro* applications, with different properties in terms of material and sizing. If large-scale Multi-Electrode-Arrays and macro-electrodes used in Functional Electrical Stimulation or Deep Brain Stimulation (DBS) are indeed very different, the charge transport phenomena at the electrode-electrolyte interface is similar.

The electrical modeling of this interface has been widely addressed in the literature, leading to equivalent models well-known by specialists in electro-chemistry, theoretical physics or biosensors [1]. The electrical behavior of this interface is complex and integrates fractal and non-linear effects [2]–[4]. Some authors propose an implementation of the model, compatible with classical electrical simulators [3], [4]. In these approaches, the electrical model is used as a support to extract qualitative information about the tissue or interface properties.

For the design of front-end circuits in neuro-electronic systems, it is important to account for the interface electrical model, because its impedance clearly affects the recorded biopotential and the effective injected current for the stimulation case. When used by circuit designers, the electrical model of the tissue-electrode interface is often over-simplified and linearized, to be easily integrated in electrical simulators

[5], [6]. If this approach is relevant in the recording conditions which correspond to low level voltages across the interface (smaller than $1mV$), it is no longer acceptable for electrical stimulation where high levels of current are involved. Another important point is the electrical characterization method for the interface. A classical technique is the impedance spectroscopy which assumes the small signal AC behavior.

Our objective is to develop a characterization and modeling protocol of the electrode-tissue interface, in conditions of electrical stimulation and compatible with *in vivo* measurements. To respect safety conditions and avoid irreversible degradation of the tissue, it is recommended to stimulate in current mode and to use biphasic current impulses. We strictly respect these conditions regarding the input signals used in the characterization protocol. The amplitude of the input waveform is progressively increased to characterize the non-linear behavior and the modeling protocol is also based on these *in vivo*-compatible signals. As a case study, we consider the experimental investigation of DBS effects on small rodents.

In this paper we describe the whole characterization and modeling procedure, taking into account the fractional and non-linear aspects of the model. We assess the procedure and present results on *in vitro* measurements, with a standard macro-electrode used for Sub-Thalamic Nucleus stimulation of small rodents.

II. MEASUREMENT SETUP AND RESULTS

Electrical stimulation of biological tissues is preferably done by a current source [7], [8], as it is a natural way to control the injected electrical charge. Balancing the total injected charge is important to avoid tissue damage [7]. In order to reach these specifications, we have developed a specific setup.

A. Impedance measurement with current amplitude control

The measurement bench uses of a programmable arbitrary waveform generator (*Agilent 33250A*) to control the stimulus applied to the electrode. This generator has a voltage output, nevertheless our goal is to stimulate the tissue in current mode. For this purpose we designed a conversion circuit shown in figure 1(a). Voltage across the electrode is sensed by a

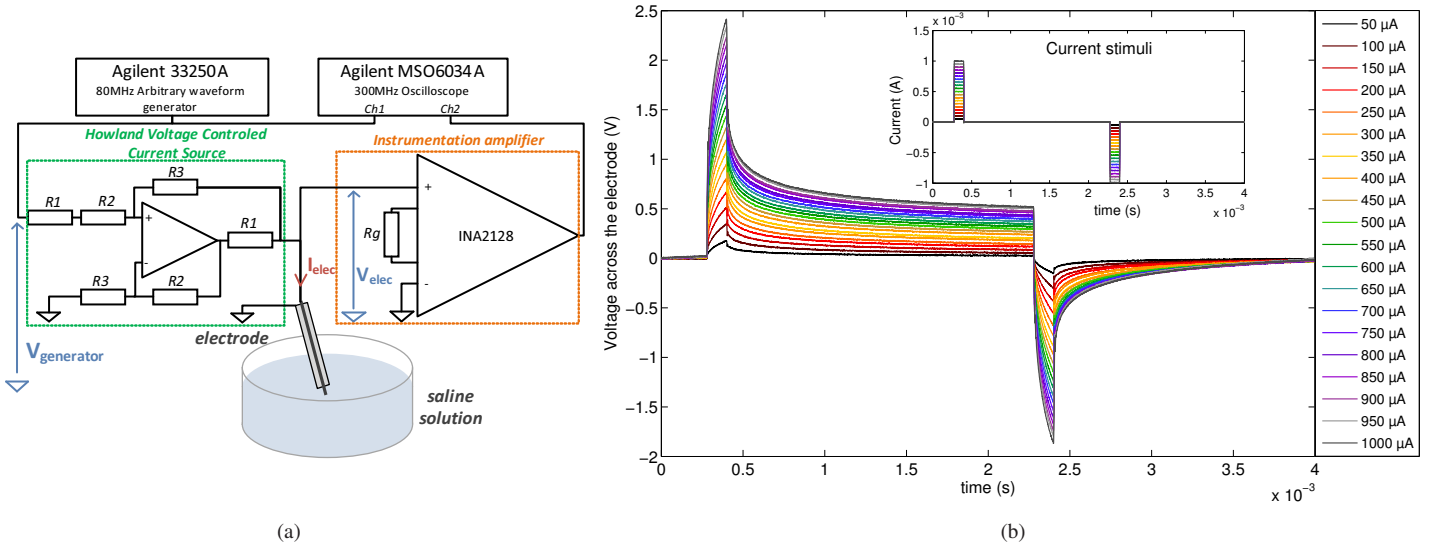


Fig. 1. 1(a) Impedance measurement system. The spectral analyzer is connected to a Howland Voltage Controlled Current Source (VCCS) and to the electrode; voltage across the electrode V_{elec} is recorded through an instrumentation amplifier, which gain can vary from 0 to 100 dB. 1(b) Measured voltage step responses for different amplitude of constant current biphasic stimulus.

preamplifier and recorded with an *Agilent MSO6034A 300 MHz* Oscilloscope.

Assuming that the input impedance of the instrumentation amplifier is infinite, the Howland Voltage Controlled Current Source (VCCS) provides:

$$\begin{cases} I_{elec} = G \cdot V_{in} - \frac{V_{elec}}{r_{out}} \\ G = \frac{1}{R_1} \\ r_{out} = \frac{R_1 R_2 (R_2 + R_3)}{R_3^2 - R_2^2} \end{cases} \quad (1)$$

where G is the transconductance of the VCCS, and r_{out} its output resistance. To allow accurate measurement, r_{out} has to be huge compared to electrode impedance magnitude, therefore $R_2 = R_3$ in this design. For this application we choose $R_2 = R_3 = 100k\Omega$ with 0.01% tolerance ensuring a minimal output impedance of several $G\Omega$. Two values of G (1mS and 0.1mS) have been used, corresponding respectively to $R_1 = 1k\Omega$ or $10k\Omega$. Current amplitude applied to the electrode varies from $1\mu A$ to $2mA$; V_{elec} can be expected to cover the same range of variation. A low noise instrumentation amplifier (INA2128), controlled with different values of R_g , was added to provide gain for small voltage amplitudes and high input impedance (over $1G\Omega$) in the recording loop.

Since the electrode impedance is defined as :

$$Z_{elec}(s) = \frac{V_{elec}(s)}{I_{elec}(s)} \quad (2)$$

where s is the Laplace-domain variable, the measurement setup provide impedance evaluation with respect of :

$$\begin{cases} i_{elec}(t) = G \cdot V_{Ch1}(t) \\ v_{elec}(t) = \frac{V_{Ch2}(t)}{A_v} \end{cases} \quad (3)$$

where A_v is the gain of the instrumentation amplifier, V_{Ch1} and V_{Ch2} are the recorded voltages on channels 1 and 2 (see Fig. 1(a)). This setup was used on a concentric bipolar electrode (NEX100, *Phymep, France*) used for DBS experimentation on rats. The electrode was placed in a Hank's Balanced Salt Solution (*Thermo Scientific HyClone, SH3058801*), which composition is similar to extra-cellular environment.

Signals injected through the electrode were charge balanced without DC, in order to prevent from electrochemical reactions [7]. Such signals with the same setup could be used *in vivo* as they ensure the integrity of living tissues surrounding the electrode.

B. Measurement methods and results

Typically, electrical neuronal stimulation induces physiological response by applying charged balanced constant current biphasic pulses. A first negative (*cathodic*) pulse initiates membrane depolarization of targeted cells ; then a positive (*anodic*) pulse allows to obtain an overall zero net charge at the end of a stimulation period.

Measurements with similar waveforms are shown in figure 1(b). Stimulation has been applied with current in the range from $50\mu A$ to $1mA$ with a step of $50\mu A$. The duration of pulses has been set to $60\mu s$ as used for DBS. A delay of $940\mu s$ between cathodic and anodic pulses was used to observe inter-pulse voltage relaxation. Recording sampling frequency was set to $1.25MHz$ and measurement noise was reduced using an averaging method.

Measured voltages presented in figure 1(b) show in first approximation a integrator behavior during pulses. Nevertheless inter-pulse relaxation presents slow variations causing an asymmetry in observed voltages. Such behavior cannot be explained by linear models based on serial and transfer resistances and double layer capacitance [9], but can be fitted using fractional order differential equations. Moreover, the voltage difference between two successive step responses tends

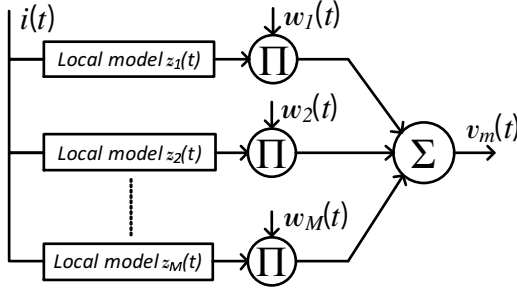


Fig. 2. Decoupled form multi-model

to decrease when the stimulation current increase, resulting in a decreasing impedance as observed in [10]. Currently, no measurement based computable model including fractional equation and current non-linearities can be found.

III. EXTRACTION OF A NON LINEAR FRACTIONAL MODEL

Taking into account the interface characterization described in section II, we used a multi-model approach to obtain a global non-linear model. The multi-model approach has been of interest since the Johansen and Foss publication [11]. To describe the non-linear behavior of a system, it uses a set of local linear models (or affine) of the system operation in various areas. The output of a local model is weighted by an activation function close to one if the operating point is near the center of the area associated to the local model, and decreasing towards zero when it moves away.

The standard form of a multi-model is:

$$v_m(t) = \sum_{k=1}^M w_k(\varphi(t)) z_k(\varphi(t)) \quad (4)$$

where $\varphi(t)$ is an input-output observation vector at time t , $w_k(\varphi(t))$ is the activation function of the local model z_k , M the number of local models. Depending on the operating point, the activation function defines the contribution of the local model in the global model. It provides a gradual transition of this local model to the others neighboring local models. However, the following conditions must be imposed:

- the activation function is positive and less than 1,

$$0 \leq w_k(\varphi(t)) \leq 1, \forall k, \forall t \quad (5)$$

- the activation functions sum is equal to 1 at any point:

$$\sum_{k=1}^M w_k(\varphi(t)) = 1, \forall t \quad (6)$$

In this application the decoupled form multi-model is used as shown in figure 2. The function $\varphi(t)$ is the current applied to the interface $i(t)$. The activation functions $w_k(t)$ can be defined by:

$$w_k(t) = \begin{cases} 1 - \lambda_{1,k}(I_k - i(t)) & \text{if } i(t) \in [I_{k-1}, I_k] \\ 1 - \lambda_{2,k}(i(t) - I_k) & \text{if } i(t) \in [I_k, I_{k+1}] \\ 0 & \text{else} \end{cases} \quad (7)$$

where I_k denotes the operating point and where $\lambda_{j,k}$ is a coefficient that permits to meet equation (6). Other activation function shapes can be defined. Due to the diffusion phenomena that takes place in the interface [12], the local impedance models are defined using fractional transfer functions [13]:

$$z_k(t) = \mathcal{L}^{-1}\{Z_k(s)\} \quad (8)$$

where :

$$Z_k(s) = K_k \left(\frac{(s/\omega_{bk})^{\gamma_k} + 1}{(s/\omega_{bk})^{\gamma_k}} \right) \quad (9)$$

The transfer function Z_k is deduced from the shape of step responses from figure 1(b). Gain K_k , corner pulsation ω_{bk} and fractional order γ_k are the result of an optimization problem that minimizes a quadratic criterion of time responses differences between model of equation (9) and measurements of figure 1(b). Examples of quantitative results are presented in table I.

$I_0(\mu A)$	$K_k(k\Omega)$	$\omega_{bk}(rad.s^{-1})$	γ_k	$\lambda_{1,k}$	$\lambda_{2,k}$
50	477	$5.78 \cdot 10^4$	0.60	0	$2.2 \cdot 10^3$
500	649	$1.56 \cdot 10^4$	0.68	$2.2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
1000	744	$9.53 \cdot 10^3$	0.72	$2 \cdot 10^3$	0

TABLE I
EXAMPLES OF PARAMETERS OBTAINED FOR $Z_k(s)$ LOCAL MODELS AND CORRESPONDING $\lambda_{j,k}$

IV. MODEL VALIDATION

Step responses of local models given in table I where computed. Resulting voltage curves and corresponding measured responses are shown in figure 3(a). In order to simulate transfer functions similar to equation (9), differentiator of order γ can be approximated by an integer order transfer function, stemming from a recursive distribution of poles and zeros as shown in [13]. Obtained results fit measurement for both step response and relaxation periods.

In order to validate the fractional multi-model a second experiment was conducted. A pseudo-random current sequence was injected through the electrode. This gaussian distributed sequence has a duration of $2ms$, a sampling frequency of $1MHz$, a root mean square of $308.3\mu A$ and a maximal amplitude of $1mA$ for the presented sequence. The measured voltage was then compared to simulation results using 3 different models :

- a fractional multi-model as described in section III ; 3 local models were used, which were extracted from $50\mu A$, $500\mu A$ and $1mA$ step responses to cover the global range of current variations,
- a single fractional model with the same form as equation (9), extracted from the $500\mu A$ step response,
- a linearized model as shown in [6] extracted from the $500\mu A$ step response.

A $30\mu s$ zoomed view of obtained signal is shown in figure 3(b). Linearized model clearly presents a deviation from measured voltage. Both others fit with a smaller error the measured voltage.

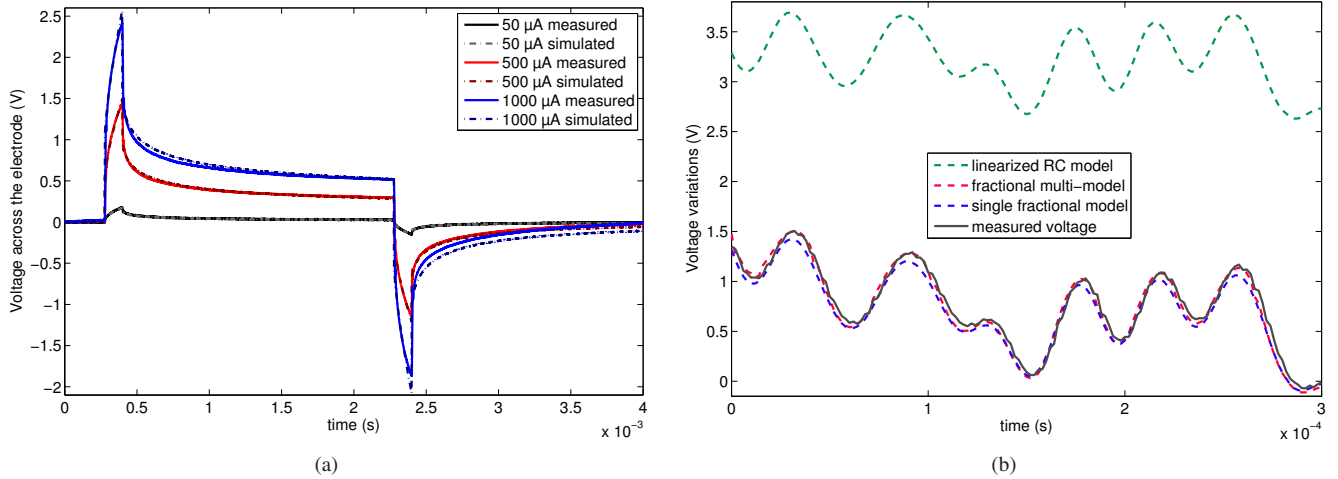


Fig. 3. 3(a) Comparison of measured step responses and simulated waveforms extracted from local models, 3(b) Comparison of voltage response to a pseudo-random current sequence obtained by measurement, fractional multi-model, single fractional model and linearized model.

In order to quantify models precision, the Normalized Root-Mean Square Error (NRMSE) between simulated and measured voltages was computed. For the linearized model response, the NRMSE is as high as 41.5%, for the single fractional model, this error is 4.9% and for the multi-model NRMSE is 4.6%. The multi-model shows a slightly better performance than the single model. However, the choice of the Gaussian distribution focuses on values around 0 to the detriment of high signal values, where the multi-model should be the most efficient. To complete this analysis, figure 3(b) provides a zoom on high values of voltage; on this interval, the NRMSE is 3.7% and 5.0% for the multi-model and the single fractional model respectively.

More generally the use of a high number of local models decreases the simulation error. Nevertheless all models are computed in parallel, so that increasing the number of local models increases the overall computation time.

V. CONCLUSION

We have presented a protocol for electrical characterization of the electrode-tissue interface, compatible with *in vivo* measurements. This technique is more suitable than the impedance spectroscopy to highlight the fractional and non linear nature of the interface. A classic model in the literature presents a rational behavior as a constant phase element. Our original approach is based on a fractional multi-model, depending on the level of injected current and able to take into account the non-linear aspect. The identification method of local models from measured impulse responses is detailed. The multi-model is then evaluated with a random current stimulation; the results show an advantage of the multi-model on the simple fractional model.

This work is encouraging and allows to go further on the study of the non-linearity taking into account the physico-chemical phenomena. The implementation of this model is based on recursive one order elements which allows to consider its use in a circuit simulator, using RC cells or a VHDL-AMS description for CAD environment.

REFERENCES

- [1] E. T. McAdams, A. Lackermeier, J. A. McLaughlin, D. Macken, J. Jossinet, "The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 10, issues 1-2, pp. 67-74, doi:10.1016/0956-5663(95)96795-Z, 1995.
- [2] H. P. Schwan, "Linear and non-linear electrode polarization and biological materials", *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 20, n. 3, pp. 269-288, doi:10.1007/BF02368531, 1992.
- [3] S. H. Liu, "Fractal model for the AC response of a rough interface", *Phys. Rev. Lett.*, vol. 55, issue 5, pp. 529-532, doi:10.1103/PhysRevLett.55.529, 1985.
- [4] G. A. Ruiz, C. J. Felice, M. E. Valentinuzzi, "Non-linear response of electrode/electrolyte interface at high current density", *Chaos, Solitons & Fractals*, vol. 25, n. 3, pp. 649-654, doi:10.1016/j.chaos.2004.11.029, 2005.
- [5] E. A. Brown, J. D. Ross, R. A. Blum, Y. Nam, B. C. Wheeler, S. P. DeWeerth, "Stimulus Artefact Elimination in a Multi-Electrode System", *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, vol. 2, n. 1, pp. 10-21, doi:10.1109/TBCAS.2008.918285, 2008.
- [6] S. K. Kelly, J. L. Wyatt, "A Power-Efficient Neural Tissue Stimulator With Energy Recovery", *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, vol. 5, n. 1, pp. 20-29, doi:10.1109/TBCAS.2010.2076384, 2011.
- [7] D. R. Merrill, M. Bikson, J. G.R. Jefferys, "Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols", *Journal of Neuroscience Methods*, n. 141, pp. 171-198, doi:10.1016/j.jneumeth.2004.10.020, 2005.
- [8] S. F. Cogan, "Neural Stimulation and Recording Electrodes", *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 10, pp. 275-309, doi:10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518, 2008.
- [9] X. F. Wei, W. M. Grill, "Impedance characteristics of deep brain stimulation electrodes in vitro and in vivo", *Journal of Neural Engineering*, vol. 6, n. 4, doi:10.1088/1741-2560/6/4/046008, 2009.
- [10] S. F. Lempka, S. Miocinovic, M. D. Johnson, J. L. Vitej, C. C. McIntyre, "In vivo impedance spectroscopy of deep brain stimulation electrodes", *Journal of Neural Engineering*, vol. 6, n. 4, doi:10.1088/1741-2560/6/4/046001, 2009.
- [11] T. A. Johansen, B. A. Foss, "Non-linear Local Model Representation For Adaptive Systems", *Proceedings of International Conference on Intelligent Control and Instrumentation*, vol. 2, pp. 677-682, doi:10.1109/SICICI.1992.637617, 1992.
- [12] J. Sabatier, H. C. Nguyen, X. Moreau, A. Oustaloup, "Fractional behavior of partial differential equations whose coefficients are exponential functions of the space variable", *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems*, vol. 19, issue 5, doi: 10.1080/13873954.2013.766805, 2013.
- [13] A. Oustaloup, F. Levron, B. Mathieu, F. M. Nanot, "Frequency-band Complex Noninteger Differentiator: Characterization and Synthesis", *IEEE Transactions on Circuits and Systems-I: Fundamental Theory and Applications*, vol. 47, n. 1, pp. 25-39, doi:10.1109/81.817385, 2000.

An Embedded Deep Brain Stimulator for Biphasic Chronic Experiments in Freely Moving Rodents

F. Kölbl, *Student Member, IEEE*, G. N’Kaoua, F. Naudet, F. Berthier, E. Faggiani, S. Renaud, *Member, IEEE*, A. Benazzouz, and N. Lewis, *Member, IEEE*

Abstract—This paper describes a Deep Brain Stimulation device, portable by rodents, for chronic experiments in the context of Parkinson’s disease. Our goal is to equip the animal with a device that mimics the human therapeutic conditions. It implies to respect a set of properties as bilateral current-mode and charge-balanced stimulation, as well as programmability, low power consumption and re-usability, to finally reach a suitable weight for long-term experiments. After the analysis of the solutions found in the literature, the full design of the device is explained. First, the stimulation front-end circuit driven by a processor unit, then the choice of supply sources which is a critical point for the weight and life-time of our system. Our low cost system has been realized using commercial discrete components and the overall power consumption was minimized. We achieved 6 days of maximal current stimulation with the chosen battery for a weight of 13.8g. Finally, the device was carried out *in vivo* on rats during a 3 weeks experiment as the used implantation technique allows battery changing. This experiment also permits to emphasize the mechanical aspects including the packaging and electrodes holding.

Index Terms—Biomedical engineering, Implants, Electrode driver, Deep Brain Stimulation, Low power.

I. ISSUES ON DEEP BRAIN STIMULATION DEVICES FOR EXPERIMENTATION ON ANIMAL MODELS

Since more than 20 years, effects of electrical stimulation of deep brain structures on motor symptoms of neurodegenerative diseases have been of interest [1]–[4]. Deep brain stimulation (DBS) involves sending electrical pulses at a given frequency in specific nuclei of basal ganglia. For Parkinson’s disease, the first attempt of DBS treatment was applied in the Ventral Intermediate Nucleus [1], which stopped rest tremor but without beneficial effects on akinesia and rigidity; afterwards, study on stimulation of other structures in animal models of the disease were conducted, showing that high frequency stimulation (HFS) of the subthalamic nucleus (STN) alleviated all the cardinal motor symptoms of Parkinson’s (PD) disease induced by MPTP in nonhuman primate model of the disease [5]. Based on this study, STN HFS was successfully applied to parkinsonian patients with advanced severe motor symptoms [2]. The electrodes of DBS, which are connected to a stimulator, are implanted chronically and continuous HFS of

the STN induces dramatic improvement of the cardinal motor symptoms, such as tremor, akinesia and rigidity [6]. However, even if the beneficial effect of DBS on PD symptoms is well established, the underlying mechanism is still under debate [7]. This knowledge should lead to improve DBS therapy and devices, as well as the application of the approach to other neurological and psychiatric disorders.

Brain disorders can be modelled in laboratory animals, in order to develop pathophysiological states associated with behavioural outcomes. Animal models can be used to understand the functional mechanisms of DBS and also to develop new applications to brain diseases resistant to drug treatments. Nevertheless, except for non-human primates, the human DBS commercial implants cannot be used in rodents because of their large size. Thus, it is mandatory to develop specific embedded stimulators that mimic therapeutic action provided in human patients and adapted to small animals.

In the present paper we propose a new DBS dedicated stimulator, adapted for chronic experiments on rodent models and that mimics the conditions of DBS human therapy: bilateral, current-controlled biphasic stimulation. Besides this objective, the device to be designed should be highly configurable and tunable by the neurophysiologists to allow for investigations. In terms of embedded system design, the different materials composing the stimulator should be individually and globally optimized: electrodes for accurate STN targeting, adapted stimulation waveforms, stimulation circuitry for low power consumption and high capacity battery [8].

The rest of the paper is organized as follows. In section II, experimental constraints on the stimulator are summed up and existing setups for rodent DBS are compared. Thereafter, the complete system design is developed. The stimulation front-end circuit and its control and supply parts are described in section III. In Section IV, an important point is discussed: the minimization of the power consumption and the selection of the energy source adapted to the constraints of the chronic experiments. Our system has not only satisfactory electrical characteristics, but it has also been tested *in vivo*. Thus the mechanical aspects of the system, the packaging, the holding of electrodes are detailed in section V, where results of implantation are also described. Finally, we discuss our results regarding the literature and conclude in section VI.

II. STATE OF THE ART OF EMBEDDED DBS STIMULATORS FOR RODENTS

Before reviewing and comparing the existing solutions, let us consider the important properties imposed to DBS devices,

F. Kölbl, G. N’Kaoua, S. Renaud and N. Lewis are with the Department of Bioelectronic in Laboratory IMS-CNRS UMR 5218, University of Bordeaux, e-mail: florian.kolbl@ims-bordeaux.fr.

F. Berthier is with CEA-Leti, Grenoble, France, e-mail: florent.berthier@cea.fr.

F. Naudet, E. Faggiani and A. Benazzouz are with the Laboratory IMN, UMR 5293 CNRS, University of bordeaux, e-mail: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr

Manuscript received March 21, 2014

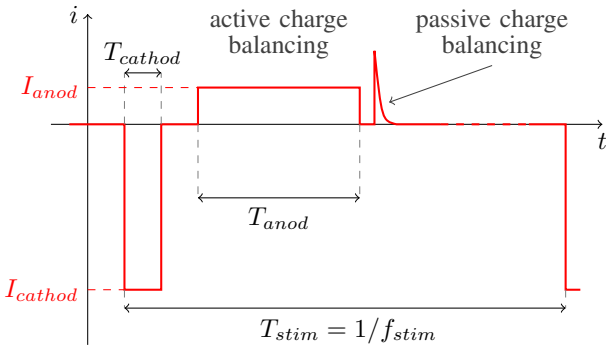


Fig. 1. Typical waveform of DBS current stimulation with active and/or passive charge balancing

according to the objectives previously announced: apply to the rodent the therapeutic conditions used for humans and be able to perform chronic stimulation on a freely moving animal.

A. Stimulator properties and corresponding design constraints

1) *Tissue safety*: Stimulation waveforms have to respect electro-neutrality of living tissue; therefore charge balanced stimulation protocols must be used [9]. Unbalanced waveforms for DBS can result in lesions around electrodes as related in [10]. As the electrical charge is the integral of current over time, DBS is often performed by constant current shaped pulses, with a total null area as detailed below.

Typical DBS current waveform is depicted in Fig. 1. A first negative current impulse, called cathodic pulse, is responsible for electrical stimulation of cells surrounding electrode contacts. Usually, the cathodic pulse duration T_{cathod} for DBS is set to $60\mu s$ [11], in the range of targeted cell chronaxy [12]; to reach therapeutic effect, the cathodic current I_{cathod} is increased until tremors stop. Pulse duration can ultimately be increased if more charges are needed to obtain the desired effect.

In order to have a charge-balanced waveform, two different techniques can be used or combined:

- **Active charge compensation**: a positive or anodic current pulse is delivered to the electrode. In order not to hyperpolarize neurons targeted by stimulation [9], the anodic current I_{anod} is lower than the cathodic current. Anodic time duration T_{anod} is then chosen to have a global charge over a stimulation period equal to zero and an interpulse delay is often added to prevent from cells hyperpolarization as explained in [9].
- **Passive charge compensation**: electrode is discharged through a resistor. This technique is the most efficient to ensure tissue safety, however the resulting current peak value is not under control and high current value can hyperpolarize targeted neurons [9].

Therefore, the design constraints related to tissue safety are to generate bidirectional currents under a wide range of voltage compliance, due to the variability and evolution of stimulated impedance

2) *Bilateral stimulation*: Chemical induced parkinsonism [13]–[16] can be either unilateral or bilateral. However, for DBS mechanism studies, behavioral evaluation has to be performed on groups of animals. In order not to induce dissymmetry in movement, bilateral Parkinsonism is used in majority of studies. This implies to implant two electrodes, one for each right and left subthalamic nucleus, and provide an adapted stimulation.

On rodents, the distance between the right and left subthalamic nuclei is relatively small ($5mm$ according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson, 1986), and electrodes have to be implanted over a short operative time to limit the impact of anesthesia on the animal. A simple solution to face this problem is to design mechanically coupled electrodes. Hence, the stimulation can be made separately, with a two-channel system, or combined, with a one-channel system delivering twice the current needed on a single electrode.

The bilateral stimulation results then in design constraints on the electrodes and on the level of the delivered current. In this paper we discuss the required stimulation current as the sum of the currents for both hemispheres.

3) *Programmability*: The DBS waveform is periodic and its frequency f_{stim} is an important parameter. Frequencies less than $10Hz$ are known to increase motor symptoms of PD, whereas frequencies over $50Hz$ tend to decrease them; furthermore, the current threshold decreases as the frequency increases [11]. A generally accepted compromise to lower current levels is to set up stimulation frequency to $130Hz$, however this parameter can be changed if unsatisfactory physiological responses are observed. All stimulation parameters (frequency, amplitude and pulse duration, as shown in Fig. 1) should be tuned to obtain motor symptom reduction, as observed in a freely moving animals.

Moreover, these parameters can change after the electrodes implantation and have then to be re-adjusted easily; some protocols even impose to stop stimulation, as for example MRI imaging. As we intend to address long-term stimulation, the design of the system must allow the easy tuning of the waveform parameters and the storage of a given experimental configuration.

4) *Freely moving animal*: This point is crucial in order to correctly evaluate therapeutic effect of DBS on rodent, especially complex motor activity and depression-like behavior [17].

Motor activity evaluation can be done using various tests. The most commonly used is the evaluation of locomotor activity in the open-field [18]–[20]. This test supposes an ease of access in the space; other motor tests have been developed to evaluate rigidity and catalepsy, which are two symptoms of PD, like for example the bar-test [21]. Parkinsonian non-motor disorders can also be quantified by the elevated plus maze [22], where the rodent has access to closed or open arms of the maze (anxiety-like behaviour), or sucrose preference [23], for which the animal is placed in the presence of two bottles to drink (depression-like behaviour). All these behavioural tests require the use of special equipments and the free motion of the animal in various areas without discomfort of being linked to an electrical device.

The resulting constraint for the stimulator is to be embedded on the rodents. As a consequence the volume and weight have to be managed. The volume is linked to the system placement in or on the body. The weight has to be bearable for the animal. We adopted an upper weight limit considering the physiology of the animal model: this limit corresponds to 5% of the average weight (around 400g) of a male *Sprague Dawley* rat, the commonly used specie for physiological experiments. The entire system (electronics, battery and cases) has to be less than 20g to limit impact on animal.

5) *Lifetime stimulation*: The embedded supply source has to provide enough energy for long term experimentation, or being changed or recharged. As a consequence, the overall power consumption has to be as small as possible without interfering with needs inherent with tissue safety. This condition has to be taken into account at all steps of stimulator design, from the front-end circuit topology to the global system powering strategy, including the choice of embedded battery.

6) *Re-usability and cost*: DBS studies on action mechanisms or side effects evaluation are based on chronic population experiments. The cost of the stimulation system has a big impact on the feasibility of experiments. The ideal stimulator for rodent experimental setup can be re-used for several experiments. In this case the battery has to be changed easily without excessive additional cost.

The need for cost effectiveness also has a repercussion on the adopted technology. Most of available stimulators are designed on chips, although custom Application Specific Integrated Design solutions can be costly solutions. All integrated solutions also have the drawback of being less flexible than the ones using off-the-shelf components, making them less adapted for therapy enhancement studies. However the use of discrete electronics impact is not in favour of the system miniaturization.

B. Existing embedded stimulators for rodents

First used methods for electrical stimulation on freely moving rodents were based on rotating wire placed over animal's cage [18]. For the time of stimulation the animal had a wire plugged over their skull. However this solution limits the number of behavioral testing to an area defined by cable length; exploration of outlying area can induce tensions on animal skull where the electrode is fixed to the skull.

Several embedded DBS systems have already been produced for rodents, trying to satisfy previously reported constraints. We propose to review these solutions, focusing on one important criterion: the location of circuit in rodent body.

Two studies [24,25] have reported systems with an electronic part implanted in the abdominal area of rodents, connected to an electrode implanted in the brain. The major advantage is that the animal can move easily after surgery. Nevertheless this choice presents major risks consecutive to surgery, like infections, especially in the abdomen region. It is then mandatory to use biocompatible materials.

In both studies, stimulation parameters are programmed using RF links; in [25], communication is done using Reed-switches and the RF emitter is a tubular device containing

the animal during the programming of stimulation. Of course, the animal movements are highly restricted and DBS action cannot be evaluated during programming. The battery is inside the animal body, implanted with the circuit, which requires additional surgery to change it, with additional infections risks. Moreover the use of RF link has a cost on global power consumption. In [24] no detail is given on tissue safety authors of [25] use charge balanced current waveforms. This first kind of DBS device is not adapted for experiments on rodents since it provides a high risk of side effects for a short time of action.

A second kind of embedded stimulators have been described in [16] and [26]. Both devices are stimulators wearable placed in vests. This solution solves two drawbacks of implanted devices: first, side effects of surgery are limited to electrode insertion and it is not necessary for electronics to be biocompatible as it is not in contact with tissues. Second, the battery is accessible on the back of the rodent and can be changed for long term experiments.

Nevertheless, such experiments are limited: animals also have to be placed in separated cages; even though, they can tear off their vest, and they risk severe brain damage if the electrodes are pulled out. The use of these wearable devices is in the end too risky for long term experimentation, even if both systems of [16] and [26] respect electrical conditions of tissues safety.

A third type of stimulators are detailed in [27] and [28]. These stimulators fixed to the skull with dental cement while electrodes are implanted into the brain. The risk of infection is limited compared to the first category of stimulators. Moreover, the risk of breaking the device is small if its volume and weight are limited. In [27] the battery cannot be changed due to the chosen packaging. In [28], the entire stimulator device can be separated from the head allowing a simple battery change and the use MRI apparatus during the experiment. Nevertheless authors of [28] did not consider the standards [9] for safe electrical stimulation.

In conclusion, the latter stimulator category seems to be the most suitable for long term experiments. All presented stimulators [16,24]–[28] were designed for unilateral stimulation, a setup only suitable for 6-OHDA-induced hemi-parkinsonism. As neurodegenerative diseases are bilateral, we have chosen to develop a system which allows bilateral implantation of electrodes in the STN of both cerebral hemispheres. For bilateral stimulation only one stimulation channel is needed but the maximum current has to be doubled.

Our system is the first DBS device developed for chronic long-term experiments on populations of rodents, respecting all safety procedures as summarized previously. Hereafter we describe in detail the circuit design, architecture and sizing, as well as considerations on power optimization, battery selection, and the specificities of the package attached to the implanted electrodes.

III. FRONT-END STIMULATION CIRCUIT

The front-end stimulation is the only part of the DBS device directly connected to electrodes. This circuit is in charge of delivering the adequate current to the tissue. It may work under

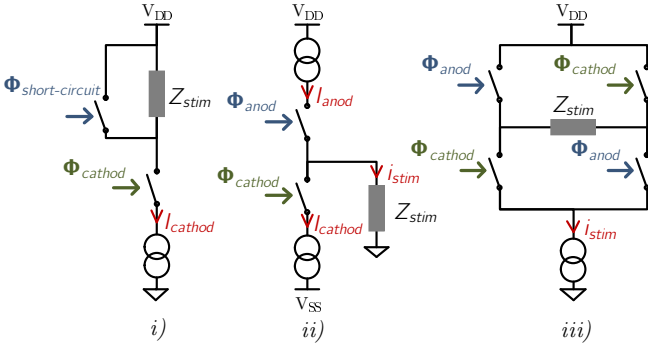


Fig. 2. Different circuits used for biphasic stimulation front-end. For structures *i*) and *iii*), the ground signal is the lowest potential of the supply source, for structure *ii*) the ground signal is the middle point of the symmetrical supply.

a high output voltage considering the impedance loading while respecting charge balancing.

A. Architectures for low-power electrical stimulation

The generic front-end for electrical stimulation consists of a current source connected to an electrode using a combination of switches. As a unique current source can only provide a monopolar current, different architectures combining switches and sources have been developed to allow the injection of positive or negative current and thus ensure charge balancing. Three structures, presented in Fig. 2, are basically used in stimulation circuits.

Structure *i*) in Fig. 2 [29]–[31] is based on one current source and two switches. This topology can only provide biphasic stimulus with passive charge balancing. Such circuits are suitable for embedded systems because of their asymmetric power supply and the simplicity of driving requirements. Nevertheless passive charge balancing is not suitable for DBS where huge amounts of charges are delivered to the tissue: the peak current reached when the electrode is in short-circuit is too high for therapeutic conditions.

Active charge balancing requires a second current source as described in [29,32]–[38] and illustrated in Fig. 2 *ii*). Anodic and cathodic currents are generated by separate sources and two switches control the timing of stimulation pulses. The electrode is referenced to ground signal, as a consequence, power supply must be symmetrical. This architecture requires a more complex powering circuitry, able to reach the high bipolar voltage needed to drive the electrode. As the resulting biasing power is approximately twice as high as for the previous topology, this architecture is not suitable for low power embedded systems. This topology is also not extremely performing in terms of charge balancing. The use of two sources at the highest and lowest potentials makes a mandatory use of respectively P and N transistors. Therefore the current sources are not perfectly paired and charges resulting from balancing errors can accumulate at the bio-electronic interface. If matching calibration techniques can be applied [39], a third switch is often added in that topology to provide passive discharge to solve such problems.

A third architecture is often used in stimulation systems [40]–[49], providing active charge balancing with one current source and four switches as shown in Fig. 2 *iii*). The current polarity through the electrode is changed, using switches organized in an H-bridge. The supply voltage is then asymmetric. The use of only one current source allows both a reduction of the global power consumption and simplifying the charge balancing. Passive charge balancing can also be performed by breaking the symmetry of switch command or by adding a fifth switch in parallel with the stimulated load. Nevertheless this structure cannot be used with multi-channel electrodes that have a common current return path as in [50] for example; in such a configuration, asynchronous stimulation of different channels can cause shortcuts between electrodes and possibly cause damage by involuntary charge injection in the tissue. In this case the Fig. 2 *ii*) is the only solution to provide biphasic current stimulation. As DBS uses a pair of electrodes with individual current return path for each cerebral hemisphere, the topology described in Fig. 2 *iii*) is the most suitable for chronic embedded DBS systems.

Whatever the adopted topology, there is a risk of involuntary charge accumulation in the tissue, due to small leakage currents. To prevent from such a situation, a DC blocking capacitor must be placed in series with the electrode. In Fig. 2, Z_{stim} is the combination of the electrode impedance and the DC blocking capacitor. The value of this additional capacitance is generally chosen so that the voltage drop is negligible compared to the voltage across the electrode in normal operation mode; nevertheless the global impedance Z_{stim} has to be taken into account when determining the maximum output voltage at the highest current values, to choose the appropriate voltage supply.

To realize our embedded DBS system, we chose the H-bridge topology presented in Fig. 2 *iii*). The system, described in Fig. 3, uses two levels of supply voltage. A low voltage supply V_{dd} , from the batteries, is connected to the current source and control circuits. The H-bridge is supplied with the high level voltage V_{HV} generated by a DC/DC converter.

V_{dd} is fixed by the choice of battery technology, and can vary due to the state of charge. In order to deliver a constant waveform over time, the stimulus generator uses a supply voltage independent current source. The schematic of this source is explained in section III-B. Additional circuits for timing control and voltage-level conversion are described in section III-C.

B. Supply-voltage-independent programmable current source

We designed a current source (see Fig. 3) that can be controlled using a variable resistance and switched ON and OFF to limit the impact of biasing on the power consumption. Transistors $T3$ and $T4$ are forming a current mirror to link the source output to the front-end stimulation. In order to reach accurate copying, $T3$ and $T4$ are matched transistors included in the *BCV61C* part. The current source is formed by the combination of $D1$, $D2$, $T2$, $R2$ and R_{var} . To reach accurate values and reproducibility, $D1$, $D2$, $T2$ and $R2$ can be found in package using a *PSSI2021SAY*. Assuming that

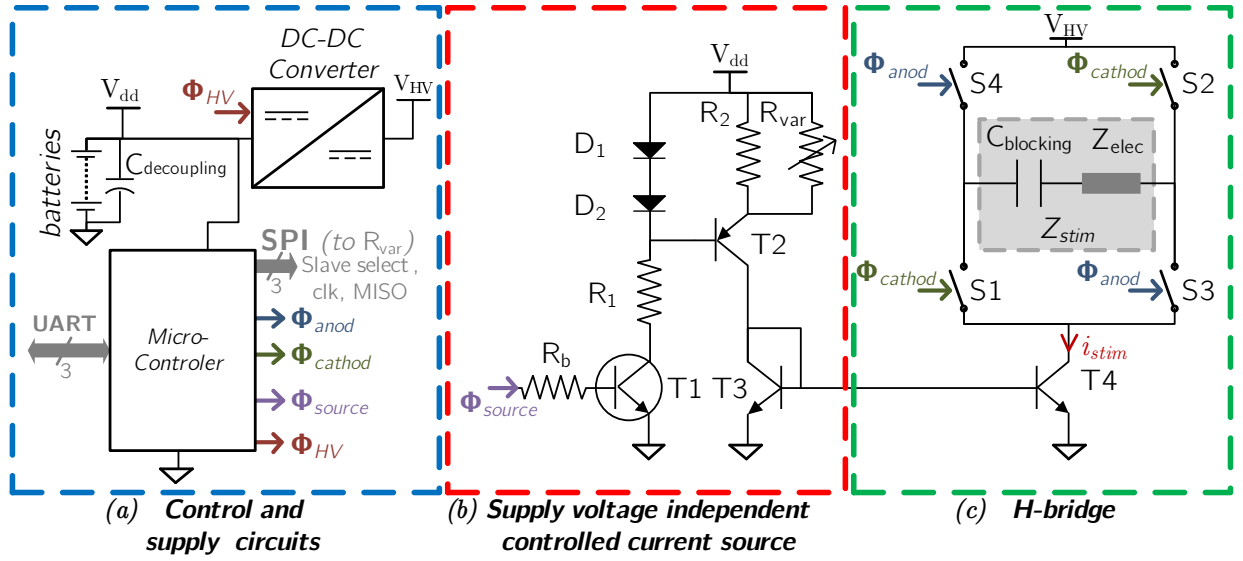


Fig. 3. Overall schematic of the developed DBS system. The circuit is divided in three parts. (c) The stimulation current (i_{stim}) is delivered to the load (Z_{stim}) composed of the electrode (Z_{elec}) and the blocking capacitor ($C_{blocking}$), by a H-bridge topology (green rectangle). (b) The current value is fixed by a supply voltage independent current source (red rectangle). (a) Supply circuits and a micro-controller (blue rectangle) drive blocks (c) and (b).

emitter and collector currents of $T2$ are equal, the biasing current is:

$$i_{cT2} = \frac{2V_{D on} - V_{be on}}{R2 // R_{var}} \quad (1)$$

where $V_{D on}$, $V_{be on}$ are voltages across the diodes and the BJT base-emitter junction. Both $V_{D on}$ and $V_{be on}$ can be considered as constant values if a sufficient biasing current is provided. If necessary, this condition can be reached by lowering the value of $R1$. Transistor $T1$ is used as an ON/OFF switch, so that minimum voltage across $R1$ is determined by:

$$V_{R1 min} < V_{dd} - 2V_{D on} - V_{ce sat T1} \quad (2)$$

Contributions of $R2$ and R_{var} can be separated. $R2$ ensures a fixed minimum current (in our case $i_{R2} = 15\mu A$) and R_{var} , when decreasing, increases stimulation current. We used for R_{var} a digitally programmable resistance (MAXIM MAX5484). The resistance variation is then linear, coded on a 10 bits value; the expression of the global stimulation current is then:

$$i_{stim} = i_{R2} + \frac{(2V_{D on} - V_{be on})}{R_{min} + D \cdot R_q} \quad (3)$$

where D is the 10 bits value coding the resistance ($D \in [0, 1023]$), R_q is the quantum of resistance ($R_q = 50\Omega$) and R_{min} ($R_{min} = 110\Omega$) is the minimum resistance of R_{var} . From this equation, one can observe that the variation law of current is a hyperbolic function of R_{var} code as illustrated in the figure 4(a). Such variations have already been used for neural electrical stimulation [26] and seem adapted to DBS, where higher values of current are not often used unless there is electrode misplacement during surgery [11].

Power on the H-bridge depends directly on electrode impedance Z_{stim} and i_{stim} ; the power consumption of the programmable current source is approximated by:

$$P_{source} \approx V_{dd} \left(\frac{V_{dd} - 2V_{D on} - V_{ce sat T1}}{R1} + i_{stim} \right) \quad (4)$$

The first term is due to the current source biasing and can be reduced by increasing $R1$ with respect to equation 2. The second term is directly linked to the required stimulation current. The supply voltage V_{dd} could be decreased, depending on the battery technology choice which will be detailed in section IV.

C. Control and supply circuits

The control circuit generates the switch commands for cathodic and anodic pulses Φ_{cathod} and Φ_{anod} by driving analog switches realized with a MAX4623, and sends the values of the required current levels through the command of the variable resistance using a Serial Peripheral Interface (SPI) link. This circuit also controls the current source bias voltage Φ_{source} and the command of the high-voltage power supply Φ_{HV} . A typical stimulation pattern is described in Fig. 4(c).

Parameters necessary to define a standard current stimulus as in Fig. 4(c) are: current sign and value, as well as timing of the cathodic and anodic phases.

Current sign management is done by generating cathodic and anodic signals in the right orders. The programming of a current value is performed with a SPI link, driving the variable resistance described in previous section (a 10 bits variable digital resistance with 1 code volatile memory register). As currents are coded on 10-bits values, two bytes are sent by the MCU to generate each current value. However, for a given SPI baud-rate, this procedure is limited by the interval between two current pulses. In typical case, the inter-pulse timing, see Fig. 1, for DBS is $60\mu s$.

The most challenging section is the switching between cathodic and anodic values. Limiting the SPI baud-rate allows to minimize the MCU frequency, and thus the power as explained in the next section. The anodic code is stored

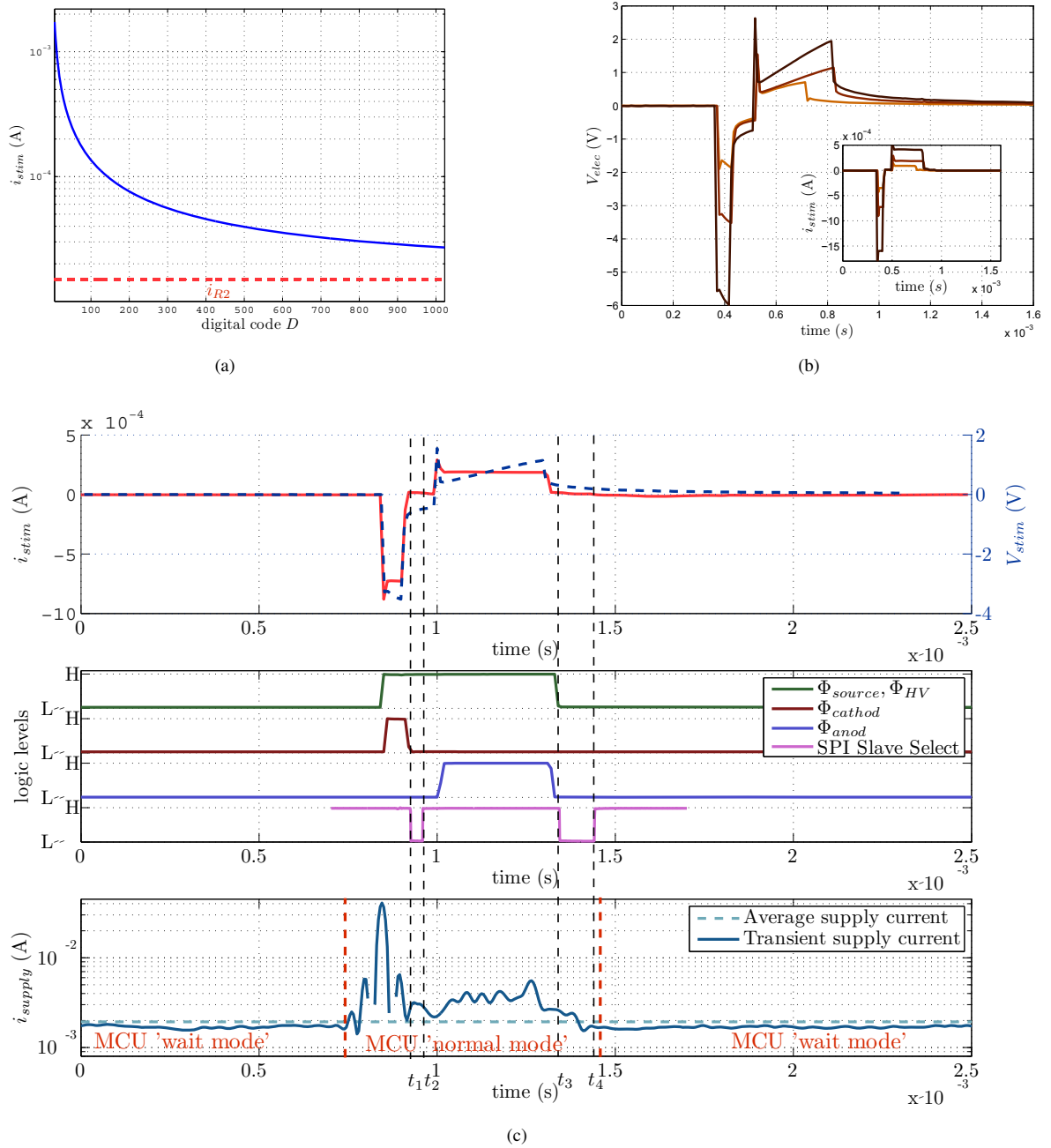


Fig. 4. (a) Graphical representation of the stimulation current i_{stim} as a function of the digital code of the variable resistance (b) Electrode response for biphasic stimulation of $I_{cathod} = 400, 800$ or $1600\mu A$ and $60\mu s$ pulse (c) Recorded chronogram of a typical stimulus ($60\mu s$ of $750\mu A$ cathodic current, charge balanced with a $250\mu A$ current pulse and $60\mu s$ of inter-pulse delay with a frequency of $130Hz$), corresponding logic commands and supply current

in the resistance's non-volatile register when initializing a new waveform, and is no longer transmitted; immediately after, the cathodic code is transmitted to the tap register to generate the first cathodic pulse. During the inter-pulse delay of each stimulation period, the non-volatile-register is copied in the resistance's tap register using a one byte communication (between markers t_1 and t_2 on Fig. 4(c)) to generate the anodic current. After the anodic phase, i.e. at the end of the stimulation waveform, the cathodic code is re-sent using two bytes to the tap register (between markers t_3 and t_4), configuring the current source for the next stimulation period.

A timing difference ($t_2 - t_1 < t_4 - t_3$) can be observed on the logic output of the SPI Slave Select. With this strategy and a limited baud-rate of $147.5 kbit \cdot s^{-1}$, the minimal inter-pulse delay is:

$$T_{inter-pulse} = \frac{N_{bits}}{BR} \geq \frac{8}{147.5 \cdot 10^3} = 54.24\mu s \quad (5)$$

With our current source and time resolution ($500ns$), charge balancing has a limited accuracy and a maximal equivalent DC current error was measured at $520nA$ with a *picoammeter/voltage source* Keitley 6487. In order to decrease this

unbalance, we implemented once every 256 periods (approximately 2s) a passive discharge, so that the maximal error was reduced to 72nA; the additional DC blocking capacitor prevents from any residual charge on the tissue.

As illustrated in Fig. 3, the high voltage level necessary to provide current stimulation is generated from the embedded battery through a DC/DC switched mode power supply. The used topology is a Boost-Converter (*Linear Technology LT3494*) that levels up the voltage. The voltage across electrodes was measured for different levels of currents [51]. As voltage depends on both current value and pulse width, a measurement was conducted on saline solution with maximum values (i.e. 2mA and 500μs) and the maximum measured voltage was near 8V, a set of electrode response voltages are presented in figure 4(b). The boost converter has to provide sufficient voltage for the electrode and for the voltage drop of DC blocking capacitor, switches and the current source. Moreover, the electrode impedance is known to increase after surgical implantation [52]. To ensure stimulation in any situation, a high voltage supply of 17.6V was used in the front end. This level can be adapted by changing external components of the used Boost-Converter.

IV. CONSIDERATIONS ON SYSTEM SUPPLYING

As often for embedded medical applications, the most challenging constraints for our chronic stimulator are the required power and energy. The power is imposed by the load, the system requirements and the circuit topology. We present in IV-A our strategy to minimize the power consumption. The energy challenge is related to the need for chronic stimulation, with minimal disturbance for the animal carrying the power source. In IV-B we will discuss the available battery technologies, and propose a suitable choice in our context.

A. Power management

In order to be integrated on animals skull, the volume and weight of the overall system have to be minimized. As the most prominent part of miniaturized systems are dedicated to power sources, the overall power of the system has to be optimized without influencing developed functionality. The power consumed by the system presented in Fig. 3 is given by:

$$P_{stimulator} = P_{\mu C} + P_{source} + P_{H-bridge} + P_{boost} \quad (6)$$

where $P_{\mu C}$ is the power of the MCU (Fig. 3 (a)), P_{source} is the power consumed by the controlled current source (Fig. 3 (a)), $P_{H-bridge}$ is the power consumed in the H-bridge (Fig. 3 (c)) and P_{boost} is the power consumed by the step-up DC/DC converter (Fig. 3 (a)).

We saw in a previous section that the current source power consumption can be reduced by limiting the diode current of D1, D2 (see Fig. 3). Moreover this current source can be turned off when not used by blocking transistor T1 (see Fig. 3). $P_{H-bridge}$ is approximated to the load power consumption as the switches equivalent resistor is negligible compared to the electrode's.

To evaluate and optimize the remaining terms, $P_{\mu C}$ and P_{boost} , we have to take into account both the mode of operation and the MCU frequency. Typical DBS stimulus waveform, as shown in Fig. 1, consists of short current pulses regarding the stimulation period. For example, consider a frequency of 130Hz, a cathodic pulse of 60μs, an inter-pulse of 60μs and an anodic pulse of 600μs (ie. a cathodic current 10 times higher than the anodic current), the percentage of the period $1/f_{stim}$ during which no stimulation is applied to electrode is:

$$1 - f_{stim} \cdot (T_{anodic} + T_{cathodic} + T_{inter-pulse}) \approx 0.906 \quad (7)$$

This simple consideration implies that the stimulation hardware can be turned off most of the time (typically, more than 90% of time) and can be turned off.

P_{boost} is inversely proportional to the efficiency of the Boost converter, and related to the output current. This current cannot be controlled since it is directly the stimulation current, but can be smoothed by adding decoupling capacitors of high values at the step-up output. Nevertheless, the boost circuit input power is also determined by its quiescent current. We choose a boost IC (*LT3494*) that can be turned in a shutdown mode, changing the quiescent current from 65μA to 1μA. Φ_{HV} (see Fig. 3) controls the boost circuit commutation between the *active* and *power saving* mode, as illustrated in Fig. 4(c).

The most power consuming part of the system is the MCU. $P_{\mu C}$ can be separated in a static part and a frequency-dependent term:

$$P_{\mu C} = P_{stat} + P_{CPU} = P_{stat} + k \cdot f_{clk} V_{dd}^2 \quad (8)$$

where k is a constant in Farad, that depends on the processor technology and sizing. The static power of the MCU (*Freescale MC9S08SH8*) is determined by its operating mode. In 'normal' mode, the static power is maximal and all peripherals are turned on. In 'Wait' mode, the static power is decreased and the CPU goes to a standby mode from which recovery is fast. One 'Stop' mode can be used to limit even more power consumption but its recovery time is incompatible with the need for fast events described on Fig. 4(c). The clock frequency used for the CPU unit of the MCU has a proportional impact on power consumption. This power saving strategy has been applied on the developed system as shown in chronogram of Fig. 4(c).

The current source and step-up are turned on before cathodic command is applied to the H-bridge (see Fig. 4(c)). This activation corresponds to the first action of the MCU, changing from 'Wait' to 'Normal' mode. After the anodic pulse, the MCU is set under 'Wait' mode again, just after shutting down the current source and the DC/DC converter. With this strategy, the supply current value is limited when no stimulation current is applied. Nevertheless f_{clk} has to be taken into account when the MCU is in *Normal* mode, ie when a stimulus is applied or when the stimulation system is receiving stimulation parameters. All these events are processed using hardware interrupts. The associated sub-routines have to be executed in time periods that are negligible compared to stimulation patterns, even configured for the shorter pulse duration (60μs). We chose $f_{clk} = 2MHz$; this value is much higher than

Technology	Typical applications	Energy density (mWh/g)
Lithium Iodine (Li/I_2)	CP	210 – 270
Lithium-Manganese Dioxide (Li/MnO_2)	CP - Nstim - DDS	230 – 270
Lithium-Carbon Monofluoride (Li/CFx)	Nstim - CD	≈ 440
Lithium-Silver Vanadium Oxide (Li/SVO)	CP - Nstim - CD	≈ 270
Lithium-Thionyl Chloride ($Li/SOCl_2$)	CD - DDS	≈ 500
Li-ion	Cochlear Implant (Secondary batteries)	
CP	: Cardiac Pacemaker	(30 – 1000 μW)
Nstim	: Neurostimulators	(30 μW – 10mW)
DDS	: Drug Delivery Systems	(100 μW – 2mW)
CD	: Cardiac Defibrillator	(30 – 100 μW)

TABLE I

TYPICAL BATTERY TECHNOLOGIES USED FOR DIFFERENT TYPES OF IMD
CORRESPONDING TO DIFFERENT POWER REQUIREMENTS

traditionally adopted clock frequencies [24,25] (under the MHz), but gives better results on power consumption. The resulting transient supply current was measured as presented in Fig. 4(c). The average supply current is 1.9mA, and the peak current around 40mA on a short period (less than 10 μs). The transient supply remains stable during the stimulation period except when the MCU is experiencing recovery time in the Wait mode.

B. Choice of supply sources

We expected to find a supply source able to deliver a current profile as in Fig. 4(c), and have the maximal energy with a system weight limit of 22.5g as specified in section II. As our current source is independent of the supply voltage, the low voltage supply V_{dd} can be chosen between 2.9V and 5.5V.

Human oriented Implanted Medical Devices (IMD) batteries have been of interest since the first implantation of pacemakers about 50 years ago [53]. Supply sources occupy 25 – 60% of their volume [54], and technology improvements have enhanced patients' quality of life, by limiting surgery. Different technologies are used for human oriented IMD, depending on the therapeutic target and associated power requirement [53]–[56], as summarized in Table I; lithium technology is largely dominant for these applications. These technologies are potentially interesting for our stimulator; however, the weight of batteries used for human IMD largely exceeds 20g. And regarding overall performances, weight and size reduction affects the total embedded energy but also reduces available power, as the surface of electrode plates is smaller.

We conducted a dedicated study to find the optimal power source, respecting our cost-effectiveness needs for chronic population implantation. In order to evaluate most adapted technologies for this system, we compared commercially accessible batteries of less than 20g. Based on available datasheets, maximal constant current was extracted and related to cell voltage to compute the available power; the energy

was computed using the capacity and the cell voltage; both parameters can then be normalized with the weight of the element. Results are shown in terms of energy versus power and energy density versus power density (see Fig. 5). This study only takes into account the average nominal power as a first criterium. To support the peak power observed in Fig. 4(c), a secondary source acting like a decoupling capacitor will be chosen, as explained later in the section.

We observe from Fig. 5 that not only lithium batteries are potential candidates for our application. Zinc technologies, except for Zn/Ag_2O , tend to have available energy higher than lithium technologies. The $NiMH$, Zn/MnO_2 and $LiPo$ batteries tend to deliver more power than other technologies. The analysis of the energy density versus power density in Fig. 5(b) results in three groups of candidates:

- The first one is composed of $NiMH$, Li/V_2O_5 , $LiPo$ and Zn/Ag_2O . It is characterized by a reduced energy density compared to others technologies ($\leq 102mWh/g$). Such batteries cannot supply the stimulator more than approximately 16 hours per gram, whereas their power density could be adapted (except for Zn/Ag_2O).
- The second group is composed of Li/CFx and the majority of Li/MnO_2 batteries; these batteries show higher energy density but have a reduced power density that makes them not suitable for the application.
- The last group is composed of Zinc/Air, Li/FeS_2 and $Li/SOCl_2$ technologies. These technologies allow for long term stimulation, their minimal energy density is higher than 3.102mWh/g (corresponding in our case to approximately 48 hours of stimulation per gram), and have satisfying specific power. Only few models of small Li/FeS_2 are available, which are not adapted for our specific spacial design needed for skull implantation.

We conducted tests with both $Zinc/Air$ and $Li/SOCl_2$ batteries. Nominal voltages are 3.6V for $Li/SOCl_2$ and 1.35V for $Zinc/Air$ cells (1.6V in open circuit), so that three $Zinc/Air$ cells in series are mandatory. $Zinc/Air$ cells packaging (button package) makes them more suitable for the final version of the stimulator. We used PowerOne zinc/air p675 Implant plus batteries for both tests and animal implantation.

We now focus on the requirement for peak power supplying. To prevent from unexpected reset of digital parts, a decoupling capacitor was used as a secondary source to supply the current peak observed in Fig. 4(c). Ceramic capacitors are simple and good candidates for such a task as their power density is much larger than conventional batteries, even if their energy density is reduced. Using a triangle approximation of the observed peak current, the minimal decoupling capacitance providing less than 100mV voltage drop for the supply profile can be determined by:

$$C_{decoupling} \geq \frac{Q}{\Delta V_{min}} \approx \frac{(I_{max} - I_{average}) \Delta t}{2\Delta V_{min}} = 16\mu F \quad (9)$$

Ceramic capacitors with these values can be found in package as small as 0603 (1608 Metric), so that impact on the final

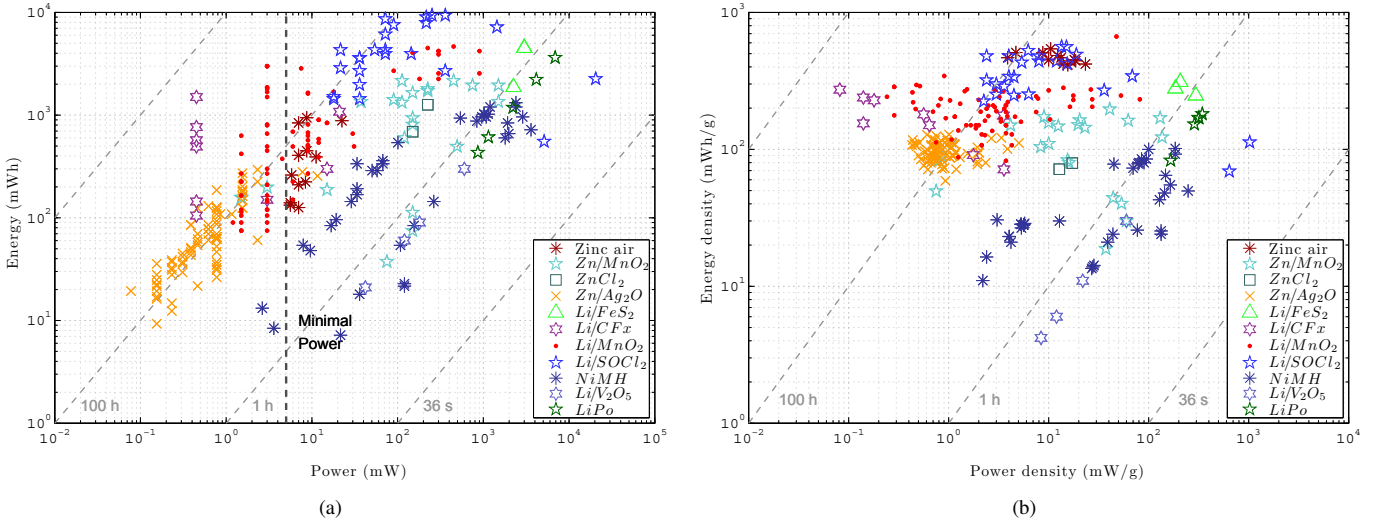


Fig. 5. Evaluation of small (commercially available less than 20g) batteries technologies: Zinc/Air, Zinc/Manganese dioxide (Zn/MnO_2), Zinc chloride ($ZnCl_2$), Zinc/Silver oxide (Zn/Ag_2O), Lithium/Iron disulfide (Li/FeS_2), Lithium/Polycarbon Monofluoride (Li/CF_x), Lithium/Manganese dioxide (Li/MnO_2), Lithium/thionyl chloride ($Li/SOCl_2$), Nickel Metal Hydrure ($NiMH$), Lithium/Vanadium pentoxide (Li/V_2O_5), Lithium polymer (LiPo); (a) energy versus power (b) energy versus power density

design size is negligible.

V. IMPLANTATION ON RODENT SKULL AND EXPERIMENTAL RESULTS

A. Mechanical implantation

All components from schematics presented in Fig. 3, except electrodes and associated blocking capacitor, have been integrated on a 6 layers printed circuit board (length: 30mm, height: 14mm) as presented in Fig. 6(c). As for external control, a reset switch for fast stimulation stopping and a three-wire RS-232 access for stimulation programming were used. MCU flashing can be performed via a dedicated on-board connector, allowing for stimulation program and user interface release without hardware replacement.

The circuit, batteries and electrodes were fixed on the skull using custom plastic packaging, designed using a 3D printer. The package is divided in two main parts:

- *The electrode container:* (Fig. 6(a)) this part, attached on the rodent's skull by surgery and fixed with dental cement, supports the electrodes for both left and right cerebral hemispheres, the blocking capacitor and an external connector (Fig. 6(b)). The plastic shape was designed as small as possible in order to limit the impact on animal behavior after surgery and acts as mechanical support for the second part's mounting
- *The stimulator container:* this part (Fig. 6(d)) is designed to fix the stimulation board and batteries on the skull. The top of the box includes a drilled column for the system to be screwed to the electrode container and to turn on the global system by contacting both poles of electrical supply.

We fabricated the plastics shape with a *Makerbot Replicator 2* with *natural PLA (polylactic acid polymer)* material. The height of the global system when mounted on the animal

is 24mm. The use of a two parts system allow for device retrieval, and facilitates MRI or other analysis where are needed. It also allows stimulator re-use when the rodent is sacrificed.

A custom electrode system has been developed. This system permits a two side implantation in one surgery of two electrodes. The distance between the two electrodes is set according to the rat brain atlas of *Paxinos and Watson (1986)* and correspond to the distance between the two targeted STN. The electrodes support board is shown in Fig. 6(b). A high value high voltage capacitor ($10\mu F$ under 25V *MURATA 0603[1608Metric]*) is embedded as close as possible to the electrodes to provide DC current blocking in any case **and lessen the impact of passive components surface on stimulator main board**. The developed electrodes are needle-like two wire electrodes of twisted tungsten (built from *tungsten Wire .008 Bare, .0110 Coated, Phymep, France*). Electrode diameter has been chosen to be similar with a widely used electrode for mono-lateral electrical stimulation of *STN* structures on rodents [58]. A first pole is made by a wire section. For the second pole, the current return half-cell electrode was constructed by a 2mm long wrap of the second conductor. The distance between the two poles is 1mm. Electrodes are associated in parallel (both cathodes are connected together, both current-return paths are connected together), and connected in series with the blocking capacitor.

The overall stimulator has a weight of 13.8g, under the limit of 20g for the targeted rodent.

B. Surgery and experimental results

The stimulator was implanted and tested on an adult male Sprague–Dawley rat weighing 324g. Surgical and experimental procedures were performed in accordance with European Communities Council Directive 2010/63/UE and National

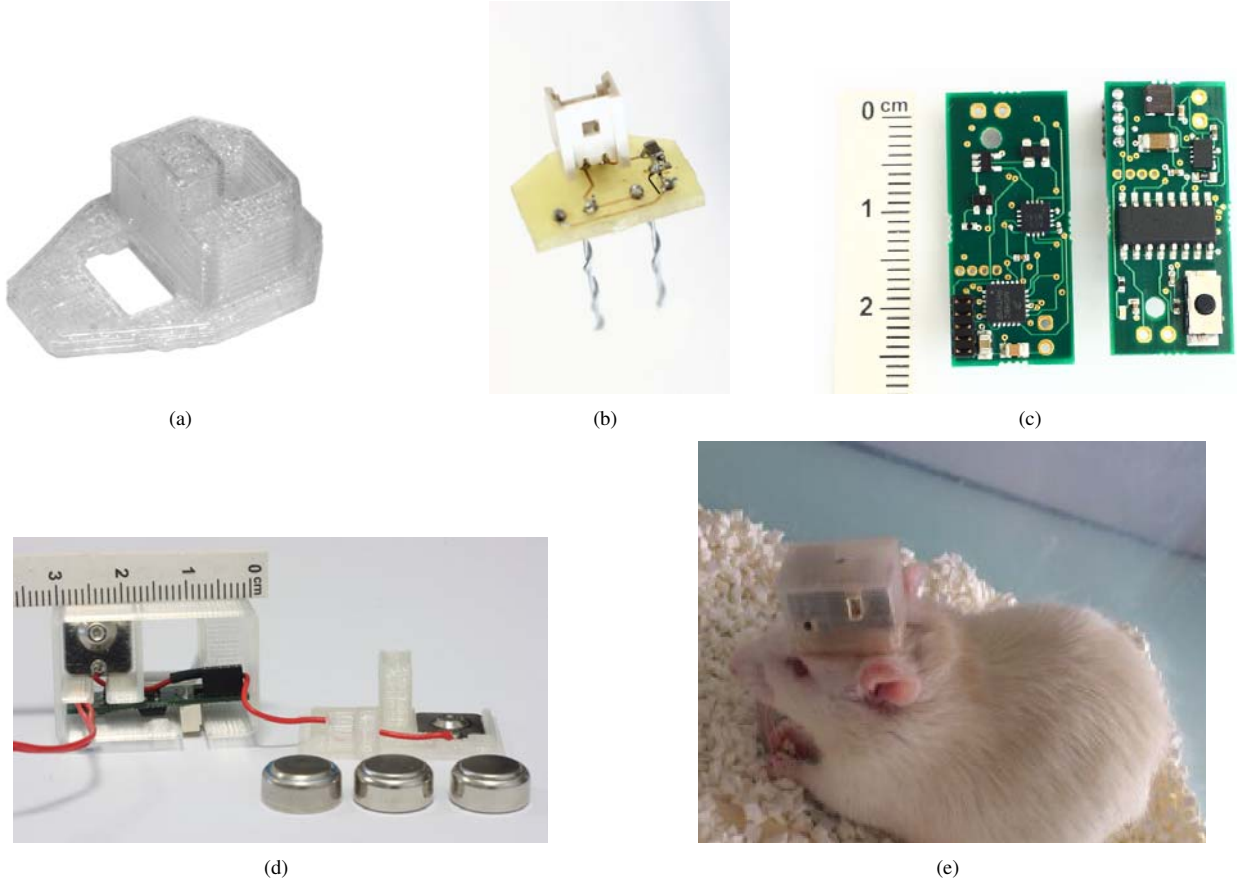


Fig. 6. Stimulator, circuit packaging and implantation on rodents' skull. (a) electrode container; this part is fixed with cement on the cranium of the rodent (b) custom electrodes for bilateral STN stimulation; both electrodes are in parallel and the support board includes the blocking capacitor (c) electrical stimulator board (d) assembled stimulator in container, shown with used Zinc/Air batteries, the top is then screwed on the electrode container after the surgery (e) stimulator chronically implanted on a rat; a three wire cable is connected to the device only for waveform programming, stimulation remains active during all experimentation phases.

Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

A first anaesthesia was induced using a mixture of *Xylazine* (10mg/kg) and *Ketamine* (7.5mg/kg). Custom concentric bipolar electrodes for both cerebral hemispheres were then implanted simultaneously in the STN under stereotaxic conditions according to the atlas of Paxinos and Watson (1986).

After this first implantation, the stimulation hardware was not directly screwed on the skull to limit postsurgical risks. Smoothed angles in the electrode support enhance the healing and thus limit animal awareness of additional material on the top of the head. **We observed no skin reaction, infection or rejection phenomena against the PLA electrode container.** The stimulator container was fixed on the animal eight days after the implantation of the stimulating electrodes, during a short and light anaesthesia induced using *isoflurane* (5% during 1 to 2 min) to prevent the rat sudden movement during the placement.

Electrical parameters of chronic stimulation were chosen according to those used in the stimulated Parkinsonian patient showing reversal of motor deficits. The frequency was fixed to 130Hz and pulse width to $60\mu\text{s}$. The stimulation intensity was

gradually increased (by steps of $50\mu\text{A}$) in order to determine the required level. Based on these tests, we used an intensity of $400\mu\text{A}$ per side, which was just below the threshold ($450\mu\text{A}$) inducing the manifestation of abnormal involuntary movements. The rat was then chronically stimulated for 3 weeks during which the animal presented normal behaviour without any visible discomfort.

VI. DISCUSSION AND CONCLUSION

Our objective was to develop a stimulator that allows safe chronic bilateral DBS in freely moving small rodents and reproduces the human therapeutic conditions. In section II, we exposed constraints that such devices have to respect for experiments on animal populations: tissue safety, bilateral stimulation, programmability, adaptation to freely moving animal, stimulation life time and reusability in a context of low cost devices. The design choices we made respect these specifications and our system was both electrically and *in vivo* characterized.

We discussed the performances of our stimulator in comparison with state-of-the-art systems **for rodents**, referenced in section II-B. In [24], the stimulator was only tested in

saline solution and authors of [16] and [26] give no detailed information about *in vivo* experiments, so we examined only [25], [27] and [28] which results are shown in Table II. A first part sums up characteristics related to *in vivo* experimentation, whereas a second part synthesizes important electrical features.

We note that none of these *in vivo* used devices are based on ASIC solution.

	[25]	[27]	[28]	This work
Biphasic	yes	yes	no	yes ($I_{error} \leq 72nA$)
Bilateral	no	no	no	yes
Programmable	yes	yes	no	yes
Removable	no	no	yes	yes
Fixation	implanted	skull	skull	skull
$I_{min}(\mu A)$	50	V.M.	50	26 $\approx 13p.h.$
$I_{max}(\mu A)$	600	V.M.	120	2036 $\approx 1018p.h.$
resolution	12 steps	50 steps		10 bits non linear
$V_{max}(V)$	18	2.5	5	17
$f_{stim}(Hz)$	131	2 – 250	130	10 – 300
time resolution		30 μs		500ns
Lifetime (days)	21	90	7 (R.B.)	6 (R.B.)

V.M. : Voltage Mode
p.h. : per hemisphere
R.B. : removable batteries

TABLE II
STIMULATORS FOR RODENT COMPARISON

Stimulators are presented in a chronological order. Most recent devices are fixed on the skull, which certainly provides greater ease of handling and reduces the risk of infection. Nevertheless the implantable device presented in [25] has electrical features compatible with required properties for DBS, in terms of current range and maximal voltage. In [27], stimulation is in voltage mode, and limited to small values that could be problematic when considering focal electrode with higher impedances. This is not compatible with our specification for current mode, ensuring a better control of injected charge. In [28], stimulation is in current mode but long term tissue safety is compromised by the absence of biphasic charge balancing.

The limited performance of our system in term of lifetime stimulation can be explained by the hardware capacity to generate a more complex waveform than in [28]. The digital part in our system is faster than [25,27], thus can reach better timing precision and accurate charge balancing. Moreover, the development of a two-piece mechanical packaging as in [28] allows for changing batteries without any additional surgery, so that the life time of the stimulation on one animal can be easily increased. Electrical stimulators in the literature are often realized with ASICs, nevertheless all of chronic *in vivo* demonstrated devices use discrete components. This consideration can be explained by the need of cost-effectiveness,

related to long-term experimentation on animal populations. Finally, let us note that no figure of merit dedicated to *in vivo* electrical stimulation exists yet, which could quantify differences between existing alternatives, and help select optimal solutions for a given experimentation.

To summarize, we developed in this paper the design procedure of an embedded stimulator, from the front-end circuit, to the choice of battery and packaging. We detailed the qualitative specifications on such systems for experimentation on small animals and deduced descriptive and quantitative elements, so that this reasoning can be re-used for further development of new devices for chronic implanted stimulation.

ACKNOWLEDGMENT

Research was supported by the french Agence Nationale de la Recherche, projects 'STN Oscillation' ANR-08-MNPS-036 and 'HYRENE' 2010-Blan-031601.

REFERENCES

- [1] A. L. Benabid, P. Pollak, C. Gervason, D. Hoffmann, D. M. Gao, M. Hommel, J. E. Perret, and J. de Rougemont, "Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus." *Lancet*, vol. 337, no. 8738, pp. 403–6, Mar. 1991.
- [2] P. Limousin, P. Pollak, A. Benazzouz, D. Hoffmann, J. F. Le Bas, E. Broussolle, J. E. Perret, and A. L. Benabid, "Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation." *Lancet*, vol. 345, no. 8942, pp. 91–5, Jan. 1995.
- [3] P. Limousin, P. Krack, P. Pollak, A. Benazzouz, C. Ardouin, D. Hoffmann, and A. L. Benabid, "Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease." *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 16, pp. 1105–11, Oct. 1998.
- [4] K. L. Collins, E. M. Lehmann, and P. G. Patil, "Deep brain stimulation for movement disorders." *Neurobiol. Dis.*, vol. 38, no. 3, pp. 338–45, Jun. 2010.
- [5] A. Benazzouz, C. Gross, J. Féger, T. Boraud, and B. Bioulac, "Reversal of Rigidity and Improvement in Motor Performance by Subthalamic High-frequency Stimulation in MPTP-treated Monkeys," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 5, no. 4, pp. 382–389, Apr. 1993.
- [6] A. L. Benabid, "Deep brain stimulation for Parkinson's disease." *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 13, no. 6, pp. 696–706, Dec. 2003.
- [7] C. Hammond, R. Ammari, B. Bioulac, and L. Garcia, "Latest view on the mechanism of action of deep brain stimulation." *Mov. Disord.*, vol. 23, no. 15, pp. 2111–21, Nov. 2008.
- [8] R. J. Coffey, "Deep brain stimulation devices: a brief technical history and review." *Artif. Organs*, vol. 33, no. 3, pp. 208–20, Mar. 2009.
- [9] D. R. Merrill, M. Bikson, and J. G. R. Jefferys, "Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols." *J. Neurosci. Methods*, vol. 141, no. 2, pp. 171–98, Feb. 2005.
- [10] W. Meissner, C. E. Gross, D. Harnack, B. Bioulac, and A. Benazzouz, "Deep brain stimulation for Parkinson's disease: potential risk of tissue damage associated with external stimulation." *Ann. Neurol.*, vol. 55, no. 3, pp. 449–50, Mar. 2004.
- [11] J. Volkmann, E. Moro, and R. Pahwa, "Basic algorithms for the programming of deep brain stimulation in Parkinson's disease." *Mov. Disord.*, vol. 21 Suppl 1, pp. S284–9, Jun. 2006.
- [12] J. Holsheimer, E. A. Dijkstra, H. Demeulemeester, and B. Nuttin, "Chronaxie calculated from current-duration and voltage-duration data." *J. Neurosci. Methods*, vol. 97, no. 1, pp. 45–50, Apr. 2000.
- [13] K. S. Bankiewicz, E. H. Oldfield, C. C. Chieueh, J. L. Doppen, D. M. Jacobowitz, and I. J. Kopin, "Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." *Life Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 7–16, Jul. 1986.
- [14] R. Heikkilä, A. Hess, and R. Duvoisin, "Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice," *Science (80-.)*, vol. 224, no. 4656, pp. 1451–1453, Jun. 1984.
- [15] U. Ungerstedt, "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 5, no. 1, pp. 107–10, Dec. 1968.

- [16] K. Nowak, E. Mix, J. Gimsa, U. Strauss, K. K. Sriperumbudur, R. Bencke, and U. Gimsa, "Optimizing a rodent model of Parkinson's disease for exploring the effects and mechanisms of deep brain stimulation." *Parkinsons. Dis.*, vol. 2011, p. 414682, Jan. 2011.
- [17] C. Delaville, J. Chetrit, K. Abdallah, S. Morin, L. Cardoit, P. De Deurwaerdere, and A. Benazzouz, "Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in parkinsonism," *Neurobiology of disease*, vol. 45, no. 2, pp. 763–773, 2012.
- [18] H. Matsumura, G. Kinoshita, S. Satoh, T. Osaka, and O. Hayaishi, "A novel apparatus that permits multiple routes for infusions and body-fluid collections in a freely-moving animal." *J. Neurosci. Methods*, vol. 57, no. 2, pp. 145–9, Apr. 1995.
- [19] A. L. Spieles-Engemann, M. M. Behbehani, T. J. Collier, S. L. Wohlgenant, K. Steece-Collier, K. Paumier, B. F. Daley, S. Gombash, L. Madhavan, G. T. Mandybur, J. W. Lipton, B. T. Terpstra, and C. E. Sortwell, "Stimulation of the rat subthalamic nucleus is neuroprotective following significant nigral dopamine neuron loss." *Neurobiol. Dis.*, vol. 39, no. 1, pp. 105–15, Jul. 2010.
- [20] S. C. Dulawa, D. K. Grandy, M. J. Low, M. P. Paulus, and M. A. Geyer, "Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli." *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 21, pp. 9550–6, Nov. 1999.
- [21] Y.-N. Wu, B. I. Hyland, and J.-J. J. Chen, "Biomechanical and electromyogram characterization of neuroleptic-induced rigidity in the rat." *Neuroscience*, vol. 147, no. 1, pp. 183–96, Jun. 2007.
- [22] A. P. Carobrez and L. J. Bertoglio, "Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on." *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 29, no. 8, pp. 1193–205, Jan. 2005.
- [23] A. Sclafani and K. Ackroff, "Reinforcement value of sucrose measured by progressive ratio operant licking in the rat." *Physiol. Behav.*, vol. 79, no. 4–5, pp. 663–70, Sep. 2003.
- [24] M. Russold and J. C. Jarvis, "Implantable stimulator featuring multiple programs, adjustable stimulation amplitude and bi-directional communication for implantation in mice." *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 45, no. 7, pp. 695–9, Jul. 2007.
- [25] D. Harnack, W. Meissner, R. Paulat, H. Hilgenfeld, W.-D. Müller, C. Winter, R. Morgenstern, and A. Kupsch, "Continuous high-frequency stimulation in freely moving rats: development of an implantable microstimulation system." *Journal of neuroscience methods*, vol. 167, no. 2, pp. 278–291, 2008.
- [26] J. Lee, H.-G. Rhew, D. R. Kipke, and M. P. Flynn, "A 64 Channel Programmable Closed-Loop Neurostimulator With 8 Channel Neural Amplifier and Logarithmic ADC." *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 45, no. 9, pp. 1935–1945, Sep. 2010.
- [27] X. Qian, H. Hao, B. Ma, X. Wen, and L. Li, "Study on DBS device for small animals." *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, vol. 2011, pp. 6773–6, Jan. 2011.
- [28] C. Forni, O. Mainard, C. Melon, D. Goguenheim, L. Kerkerian-Le Goff, and P. Salin, "Portable microstimulator for chronic deep brain stimulation in freely moving rats." *J. Neurosci. Methods*, vol. 209, no. 1, pp. 50–7, Jul. 2012.
- [29] M. Azin, D. J. Guggenmos, S. Barbay, R. J. Nudo, and P. Mohseni, "A Battery-Powered Activity-Dependent Intracortical Microstimulation IC for Brain-Machine-Brain Interface." *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 46, no. 4, pp. 731–745, Apr. 2011.
- [30] P. J. Langlois, A. Demosthenous, I. Pachnis, and N. Donaldson, "High-power integrated stimulator output stages with floating discharge over a wide voltage range for nerve stimulation." *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 4, no. 1, pp. 39–48, Mar. 2010.
- [31] X. Liu, A. Demosthenous, and N. Donaldson, "A dual-mode neural stimulator capable of delivering constant current in current-mode and high stimulus charge in semi-voltage-mode," in *Proc. 2010 IEEE Int. Symp. Circuits Syst.* IEEE, May 2010, pp. 2075–2078.
- [32] K. Abdelhalim and R. Genov, "CMOS DAC-sharing stimulator for neural recording and stimulation arrays," in *2011 IEEE Int. Symp. Circuits Syst.* IEEE, May 2011, pp. 1712–1715.
- [33] M. Hasanuzzaman, G. Simard, N. I. Krouchev, R. Raut, and M. Sawan, "Capacitive-data links, energy-efficient and high-voltage compliant visual intracortical microstimulation system," in *2013 IEEE Int. Symp. Circuits Syst.* IEEE, May 2013, pp. 646–649.
- [34] E. Noorsal, K. Sooksood, H. Xu, R. Hornig, J. Becker, and M. Ortmanns, "A Neural Stimulator Frontend With High-Voltage Compliance and Programmable Pulse Shape for Epiretinal Implants," *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 47, no. 1, pp. 244–256, Jan. 2012.
- [35] Ji-Jon Sit and R. Sarpeshkar, "A Low-Power Blocking-Capacitor-Free Charge-Balanced Electro-Stimulator Chip With Less Than 6 nA DC Error for 1-mA Full-Scale Stimulation." *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 1, no. 3, pp. 172–83, Sep. 2007.
- [36] F. Soulier, J.-B. Lerat, L. Gouyet, S. Bernard, and G. Cathébras, "A Neural Stimulator Output Stage for Dodecapolar Electrodes," in *2008 IEEE Comput. Soc. Annu. Symp. VLSI*. IEEE, 2008, pp. 487–490.
- [37] T. Tokuda, K. Hiyama, S. Sawamura, K. Sasagawa, Y. Terasawa, K. Nishida, Y. Kitaguchi, T. Fujikado, Y. Tano, and J. Ohta, "CMOS-Based Multichip Networked Flexible Retinal Stimulator Designed for Image-Based Retinal Prosthesis," *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 56, no. 11, pp. 2577–2585, Nov. 2009.
- [38] Tan, J.Y.J. and Xu Liu and Keng Hoong Wee and Shih-Cheng Yen and Yong Ping Xu and Ter Chyan Tan, "A monolithic programmable nerve/muscle stimulator," in *Neural Engineering (NER), 2011 5th International IEEE/EMBS Conference on*, April 2011, pp. 511–514.
- [39] E. K. Lee and A. Lam, "A Matching Technique for Biphasic Stimulation Pulse," in *2007 IEEE Int. Symp. Circuits Syst.* IEEE, May 2007, pp. 817–820.
- [40] S.-J. Chang, W.-Y. Chung, and C.-C. Chuang, "System Design of Implantable Micro-stimulator for Medical Treatments," in *APCCAS 2006 - 2006 IEEE Asia Pacific Conf. Circuits Syst.* IEEE, Dec. 2006, pp. 478–481.
- [41] T. G. Constantinou, J. Georgiou, and C. Toumazou, "A partial-current-steering biphasic stimulation driver for neural prostheses," in *2008 IEEE Int. Symp. Circuits Syst.* IEEE, May 2008, pp. 2506–2509.
- [42] C.-S. A. Gong, M.-T. Shiue, C.-H. Su, and Y. Chang, "An Efficient Neural-Stimulator Array Using Unitary-Size DAC With Adiabatic Base-band Scheme," in *2006 13th IEEE Int. Conf. Electron. Circuits Syst.* IEEE, Dec. 2006, pp. 29–32.
- [43] Dai Jiang, A. Demosthenous, T. Perkins, Xiao Liu, and N. Donaldson, "A Stimulator ASIC Featuring Versatile Management for Vestibular Prostheses." *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 5, no. 2, pp. 147–59, Apr. 2011.
- [44] W. Ngamkham, M. N. van Dongen, and W. A. Serdijn, "Biphasic stimulator circuit for a wide range of electrode-tissue impedance dedicated to cochlear implants," in *2012 IEEE Int. Symp. Circuits Syst.* IEEE, May 2012, pp. 1083–1086.
- [45] C. Sawigun, W. Ngamkham, M. van Dongen, and A. S. Wouter, "A least-voltage drop high output resistance current source for neural stimulation," in *2010 Biomed. Circuits Syst. Conf.* IEEE, Nov. 2010, pp. 110–113.
- [46] D.-L. Shen and Y.-J. Chu, "A linearized current stimulator for deep brain stimulation." *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, vol. 2010, pp. 6485–8, Jan. 2010.
- [47] R. Shulyzki, K. Abdelhalim, and R. Genov, "CMOS current-copying neural stimulator with OTA-sharing," in *Proc. 2010 IEEE Int. Symp. Circuits Syst.* IEEE, May 2010, pp. 1232–1235.
- [48] Willand, M.P. and Lopez, J.P. and de Bruin, H. and Fahnestock, M. and Holmes, M. and Bain, J.R., "A New System and Paradigm for Chronic Stimulation of Denervated Rat Muscle." *J Med Biol Eng.*, vol. 31, no. 2, pp. 87–92, 2011.
- [49] Eftekhari, A. and Constantinou, T.G. and Triantis, I.F. and Toumazou, C. and Drakakis, E.M., "Towards a reconfigurable sense-and-stimulate neural interface generating biphasic interleaved stimulus," in *Neural Engineering, 2007. CNE '07. 3rd International IEEE/EMBS Conference on*, May 2007, pp. 438–441.
- [50] R. Bhandari, S. Negi, and F. Solzbacher, "Wafer-scale fabrication of penetrating neural microelectrode arrays." *Biomed. Microdevices*, vol. 12, no. 5, pp. 797–807, Oct. 2010.
- [51] F. Kolbl, J. Sabatier, G. N'Kaoua, F. Naudet, E. Faggiani, A. Benazzouz, S. Renaud, and N. Lewis, "Characterization of a non linear fractional model of electrode-tissue impedance for neuronal stimulation," in *2013 IEEE Biomed. Circuits Syst. Conf.* IEEE, Oct. 2013, pp. 338–341.
- [52] S. F. Lempka, S. Miocinovic, M. D. Johnson, J. L. Vitek, and C. C. McIntyre, "In vivo impedance spectroscopy of deep brain stimulation electrodes." *J. Neural Eng.*, vol. 6, no. 4, p. 046001, Aug. 2009.
- [53] R. Latham, "Biomedical applications of batteries," *Solid State Ionics*, vol. 172, no. 1–4, pp. 7–11, Aug. 2004.
- [54] C. L. Schmidt and P. M. Skarstad, "The future of lithium and lithium-ion batteries in implantable medical devices," *J. Power Sources*, vol. 97–98, pp. 742–746, Jul. 2001.
- [55] D. C. Bock, A. C. Marschilok, K. J. Takeuchi, and E. S. Takeuchi, "Batteries used to Power Implantable Biomedical Devices." *Electrochim. Acta*, vol. 84, pp. 155–164, Dec. 2012.
- [56] X. Wei and J. Liu, "Power sources and electrical recharging strategies for implantable medical devices," *Front. Energy Power Eng. China*, vol. 2, no. 1, pp. 1–13, Mar. 2008.

